

**Die Replikation des Rhizobium lupini
Chromosoms: Bidirektionale Replikation
mit zwei Startpunkten**

von
Berthold Jeßberger
aus
Bad Neustadt/S

1976 # 115



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die Replikation des *Rhizobium lupini* Chromosoms: Bidirektionale Replikation mit zwei Startpunkten

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von
Berthold Jeßberger
aus
Bad Neustadt/S

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 4.2.1976

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. H. Remmert

Erstberichterstatter: Prof. Dr. W. Heumann

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. E. Schweizer

I n h a l t :

	Seite
1. <u>Zusammenfassung</u>	4
2. <u>Einleitung</u>	5
3. <u>Material und Methoden</u>	7
3.1. Bakterienstämme	7
3.2. Chemikalien	8
3.3. Bakterienanzucht	8
3.3.1. Medien	8
3.3.2. Übernachtkulturen von <u>R.lupini</u>	9
3.3.3. Messung der optischen Dichte	9
3.3.4. Waschen der Zellen	9
3.4. Nalidixinsäurebehandlung zur Synchroni- sierung in <u>E.coli</u>	10
3.5. Größenklassifizierung von Zellen zur Synchronisation in Bakterien	10
3.6. Zellvolumenbestimmung mit dem Coulter Counter zum Nachweis der Synchronisation .	11
3.7. Mutagenese mit NTG	12
4. <u>Ergebnisse</u>	13
4.1. Prinzip der sequentiellen Mutagenese . . .	13
4.2. Synchrones Wachstum von <u>R.lupini</u> Zellen . .	15
4.2.1. Die Methode der Nalidixinsäurebehandlung zur Synchronisierung von Bakterienzellen .	15
4.2.2. Synchronisierung der <u>R.lupini</u> Zellen durch Isolierung gleichvolumiger Zellen . .	21

	Seite
4.2.2.1. Sedimentationsanalyse der Bakterien im Sucrosegradient	21
4.2.2.2. Größenverteilung von <u>R.lupini</u> im Sucrosegradient	24
4.2.2.3. Synchrones Verhalten der kleinen Zellen in Flüssigmedium	27
4.2.2.4. Synchrones Wachstum von kleinen und großen Zellen aus dem Sucrosegradient . . .	28
4.2.2.5. Vergleichende Synchronisation von <u>E.coli</u> und <u>R.lupini</u> Zellen nach Größenselektion im Sucrose- und im Ficoll-Gradienten . . .	32
4.3. Sequentielle Mutagenese in <u>R.lupini</u> . . .	37
4.3.1. Auswahl geeigneter Mutanten	37
4.3.2. Versuchsaufbau zur sequentiellen Muta- genese	42
4.3.3. Veränderung der Mutationsrate während der NTG-Behandlung einer synchronisier- ten Kultur	46
4.3.4. Zeitlicher Vergleich der Mutations- raten verschiedener Genmarkierungen . . .	52
4.3.5. Aufstellung einer Replikationskarte nach dem zeitlichen Auftreten der Mutationsma- xima	54
5. <u>Diskussion</u>	56
5.1. Synchronisation von <u>R.lupini</u> Zellen nach Zellgrößenselektion	56

	Seite
5.2. Die Methodik der sequentiellen Mutagenese bei <u>R.lupini</u>	60
5.3. Die Replikationskarte für einige Markierungen bei <u>R.lupini</u>	62
5.4. Das Replikationsmodell für <u>R.lupini</u>	64
5.4.1. Bidirektionale Replikation des <u>R.lupini</u> Chromosoms	64
5.4.2. Zwei Startpunkte der Replikation des <u>R.lupini</u> Chromosoms	67
5.5. Die Genkarte des <u>R.lupini</u> Chromosoms, aufgestellt mit Hilfe der sequentiellen Mutagenese	71
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	77

1. Zusammenfassung

Die Einteilung nach Grössenklassen ermöglichte die Synchronisierung der R.lupini Zellen, wobei Zellen gleichen Volumens im Sucrosegradient selektioniert wurden. Die synchronisierten Zellen wurden einer wiederholten Mutagenese mit Nitrosoguanidin unterworfen und die Mutationshäufigkeit der Reversionen und der Resistenzausbildung bestimmt. Die periodische Variierung der Mutationsfrequenz beweist die Eigenschaft von Nitrosoguanidin, im Bereich der Replikationsgabel des Chromosoms gehäuft Mutationen zu induzieren. Dies erlaubt die Aufstellung einer Replikationskarte, die die Reihenfolge der mutierten Gene anhand der Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese zeigt. Das Auftreten zweier möglicher Genorte in der Replikationskarte wird diskutiert. Dabei erbringt ein Vergleich dieser Karte mit der aus Konjugationsexperimenten gewonnenen genetischen Karte Aufschluß über die Replikation des R.lupini Chromosoms : Das R.lupini Chromosom besitzt pro Fertilitätsregion eine Position, an der die Replikation beginnt. Der Ort des Replikationsanfanges liegt ungefähr in der Mitte jeder Transfereinheit. Die Replikation erfolgt bidirektional.

2. Einleitung

Rhizobium lupini, ein sternbildendes Bodenbakterium, besitzt ein ringförmiges Chromosom (HEUMANN, 1968), das semikonservativ repliziert wird (MATTES, 1974). Die genetische Analyse erfolgte bisher mit Konjugationsexperimenten und zeigte die Existenz von zwei chromosomalen Kopplungsgruppen (c- und d-Region), die unabhängig voneinander übertragen werden (HEUMANN et al., 1971). Beide Regionen enthalten je eine Fertilitätseinheit (Fc und Fd), die am Anfang des transferierten Moleküls liegt (HEUMANN et al., 1973).

Eine weitere genetische Analyse des R. lupini Chromosoms soll mit Hilfe der sequentiellen Mutagenese vorgenommen werden. Bei der sequentiellen Mutagenese wird die Region um den Replikationspunkt spezifisch mutiert. Erfolgt die Replikation des Bakterienchromosoms synchron, so wird nacheinander jedes Gen zu einer bestimmten Zeit repliziert und dabei mutiert. Anhand der Mutationshäufigkeit kann man die Replikationszeit eines bestimmten chromosomalen Gens bestimmen. Aus der zeitlichen Zuordnung der mutierten Gene läßt sich eine Replikationskarte erstellen. In E. coli verdeutlicht sich mit dieser Methode die bidirektionale Replikation (HOHLFELD und VIELMETTER, 1973), wie sie schon anhand anderer Techniken diskutiert wurde (BIRD et al., 1972; JONASSON, 1973).

Ziel dieser Arbeit ist es, die vegetative Replikation des R.lupini Chromosoms mit dem Verfahren der sequentiellen Mutagenese zu studieren. Hierfür wird eine geeignete Synchronisationstechnik für R.lupini Zellen ermittelt und diese zur Verwendung für die sequentielle Mutagenese ausgebaut. Die Methode der sequentiellen Mutagenese wird für einige chromosomale Markierungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß dieses Verfahren es ermöglicht, die Anordnung der Markierungen auf dem R.lupini Chromosom zu überprüfen und Aussagen über den Replikationsmechanismus in R.lupini zu treffen.

3. Material und Methoden

3.1. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. I aufgeführt. Ihr Fertilitätstyp, genetische Markierung und Herkunft werden dort angegeben. Die Abkürzungen erfolgten nach DEMEREC et al. (1966).

Stamm	Nr.	Genotyp	Fertilitätstyp	Lage der aux.Mark. in Region	Herkunft
R.lupini	1-20	hisC	Fc ⁻ Fd ⁺	c	HEUMANN, 1968
	1-58	metA	Fc ⁺ Fd ⁺	d	HEUMANN, 1968
	1-297	argA	Fc ⁻ Fd ⁺	d	NO ₂ -Mutanten von prt Re-kombinanten aus Kreuzung 7-10 x 1-42
	1-311	cysE str-r	Fc ⁺ Fd ⁺	c	
	1-513	ilvB	Fc ⁻ Fd ⁻	d	NO ₂ -Mutante von 1-32 (HEUMANN, 1968)
E.coli	K 12	Wildtyp			R. SCHMITT, Univ.Regensburg.

Tab. I

3.2. Chemikalien

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG)

SERVA, Heidelberg

Nalidixinsäure

SERVA, Heidelberg

Sucrose (Saccharose)

MERCK, Darmstadt

Ficoll (MG 400 000)

PHARMACIA, Uppsala, Schweden

EDTA (Titriplex)

MERCK, Darmstadt

Streptomycin (-sulfat)

SERVA, Heidelberg

Kanamycin

GRÜNENTHAL, Stolberg

Dimethylsulfoxid (DMSO)

MERCK, Darmstadt

3.3. Bakterienanzucht

3.3.1. Medien

NB Vollmedium (8g Nutrient broth (DIFCO) pro
1 000 ml dest. Wasser)

MM Minimalmedium (HEUMANN, 1968)

NB+Str Vollmedium + 200 µg/ml Streptomycinzusatz

NB+Kan Vollmedium + 50 µg/ml Kanamycinzusatz

MM+CAA Minimalmedium + 0.5% Casamino acids (DIFCO)

MM+AS Minimalmedium + 20 µg/ml der gewünschten
Aminosäure (Cystein wurde wegen seiner ge-
ringen Wasserlöslichkeit in 1 ml 0.1 N NaOH
(10 mg Cystein) gelöst.)

Festmedium Zugabe von 10g/l Bacto-Agar (DIFCO) zu

1 000 ml Medium

3.3.2. Übernachtskulturen von R. lupini

10 ml NB oder MM+AS wurden mit Bakterien von der Stammpatte inokuliert und über Nacht bei 30°C in einem Schüttelwasserbad belüftet. In Vollmedium wuchsen die Zellen bis in die Stationärphase, in MM+AS dagegen befanden sich die Zellen am nächsten Morgen noch in der logarithmischen Phase.

3.3.3. Messung der optischen Dichte

Zur Messung der optischen Dichte diente ein Spectronic 20 (Bausch und Lomb, Rochester, New York) oder ein PMQ II (C. Zeiss, Oberkochen) mit Küvetten von 1.2 cm bzw. 1 cm Lichtweg. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen.

3.3.4. Waschen der Zellen

Das Waschen der Zellen erfolgte durch Zentrifugation der Suspension bei 10 000 Upm, 10 Min. und 5°C und anschließendem Wiederaufnehmen der Zellen in frischem Medium. Sollte der Waschvorgang schnell erledigt werden (siehe sequentielle Mutagenese), so wurde die Suspension durch einen 25 mm großen Membranfilter (SM 11 156, 0.45 µ Porendurchmesser, Sartorius, Göttingen) filtriert und mit dem gleichen Flüssigkeitsvolumen

gewaschen. Durch Schütteln des Filters im frischen Medium wurden die Zellen resuspendiert.

3.4. Nalidixinsäurebehandlung zur Synchronisierung in E.coli

Eine logarithmisch wachsende E.coli Kultur wird mit Nalidixinsäure (10 µg/ml) versetzt und für eine Generationszeit im Schüttelwasserbad belüftet. Nach Waschen der Zellen und Überimpfen in nalidixinsäure-freies Medium zeigen die Bakterien synchrones Wachstum.

3.5. Größenklassifizierung von Zellen zur Synchronisation in Bakterien

Mit geernteten Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur wird ein linearer Sucrosegradient (5-20% w/w Sucrose, 30 ml) überschichtet und 15 Min. bei 4 000 Upm im Ausschwingrotor (Beckman, JS-7.5) zentrifugiert. Bakterien mit geringem osmotischen Widerstand werden auf einen Ficoll-Gradient (2-12% w/w Ficoll, 30 ml) geschichtet und bei 2 000 Upm 30 Min. im Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Gradientenabnahme erfolgt von oben mit einer sterilen Kapillare. Die Bakterien-suspension wird abgesaugt und tropfenweise fraktioniert. Pro Fraktion werden 10 Tropfen aufgefangen.

Die Fraktionen der obersten Bakterienschicht werden weiter kultiviert.

3.6. Zellvolumenbestimmung mit dem Coulter Counter zum Nachweis der Synchronisation

Zur Zellvolumenbestimmung dient die Geräteeinheit Coulter Counter, Größenanalysator und Schreiber (Coulter Electronics, Krefeld). Proben der synchronisierten Kultur werden in 0.9%-iger NaCl-Lösung auf $2-8 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Die NaCl-Lösung wird zuvor von großen Partikeln durch Filtration (50 mm Membranfilter, SM 113 07, 0.2 μ Porendurchmesser, Sartorius, Göttingen) gereinigt. Die Zellzahl in 0.1 ml der verdünnten Probe wird im Coulter Counter mit einer Kapillare von 15 μ Durchmesser bestimmt.

Mit dem an den Coulter Counter angeschlossenen Größenanalysator wird die mittlere Größe der Impulse pro Messung errechnet und vom Schreiber des Meßsystems ausgedruckt. Die Impulsgrößenverteilungskurve gibt proportional die Volumenverteilung der Zellen wieder. Das mittlere Volumen der Zellen jeder Probe kann aus einer Eichgeraden abgelesen werden, die mit Eichpartikeln (Latex) erstellt wird.

3.7. Mutagenese mit NTG

4 mg NTG, in 1 Tropfen Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, wird mit sterilem dest. Wasser auf 2 mg/ml verdünnt. Mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml NTG wird eine logarithmisch wachsende Bakterienkultur durch 5 minütige Inkubation ohne Belüftung mutagenisiert. Durch schnelle Filtration durch einen 25 mm großen Membranfilter (0.45 µm Porendurchmesser) wird die Mutagenese abgebrochen. Alle Geräte und Medien sind für R.lupini auf 30°C und für E.coli auf 37°C vorgewärmt.

Hinweis auf die Gefährlichkeit von NTG:

Die mutagene und karzinogene Wirkung von NTG und seinem Zerfallsprodukt Diazomethan (DRUCKREY et al., 1966; CERDA-OLMEDO et al., 1968) erfordert höchste Vorsicht beim Gebrauch!

Folgende Vorsichtsmaßnahmen sind zu treffen:

- a) Abwiegen von NTG nur mit Handschuhen, anschließend Hände waschen!
- b) NTG-Lösung nur mit Pipettierhilfe pipettieren!
- c) pH der NTG-Lösung im Neutralbereich wählen, da NTG im sauren und alkalischen pH in das gasförmige Diazomethan zerfällt.
- d) Hitze einwirkung vermeiden (Zerfall!).
- e) Gefäße mit NTG-Lösungen nach Gebrauch mit viel Wasser spülen!

4. Ergebnisse

4.1. Prinzip der sequentiellen Mutagenese

Das Konzept der sequentiellen Mutagenese ist in Abb. 1 dargestellt. Ein lineares Chromosom mit den willkürlich angenommenen Markierungen a, b und c wird einer synchronen Replikation unterworfen. Dabei wandert der Replikationskomplex über das Chromosom und repliziert zu den Zeiten t_1 , t_2 und t_3 die Gene a, b und c. Bei einer sequentiellen Mutagenese erhält dieses lineare Chromosom während seiner Replikation zu aufeinanderfolgenden Zeiten Mutagenesepulse mit NTG. Da NTG bevorzugt die Region um den jeweiligen Replikationspunkt mutiert, läßt sich zur Zeit t_1 die Markierung a mit größerer Effizienz zu a^+ mutieren als zu anderen Zeiten. Das gleiche gilt für die Markierungen b und c zu den Zeiten t_2 bzw. t_3 . Trägt man die Mutationshäufigkeit dieser genetischen Markierungen gegen die Zeit auf, so ergeben sich innerhalb eines Replikationszyklus Maxima, die genau den Zeitpunkt widerspiegeln, an dem die entsprechenden Gene repliziert werden. Aus der Reihenfolge der Maxima einer solchen graphischen Darstellung kann man so auf den Abstand und die Sequenz der untersuchten Gene auf dem Chromosom schließen. Zur Aufstellung einer derartigen Chromosomenkartierung benötigt man also einen Stamm,

der sich erstens synchronisieren und zweitens durch NTG mutieren läßt. Im folgenden werden zunächst die Methoden zur Synchronisierung von R.lupini Zellen untersucht.

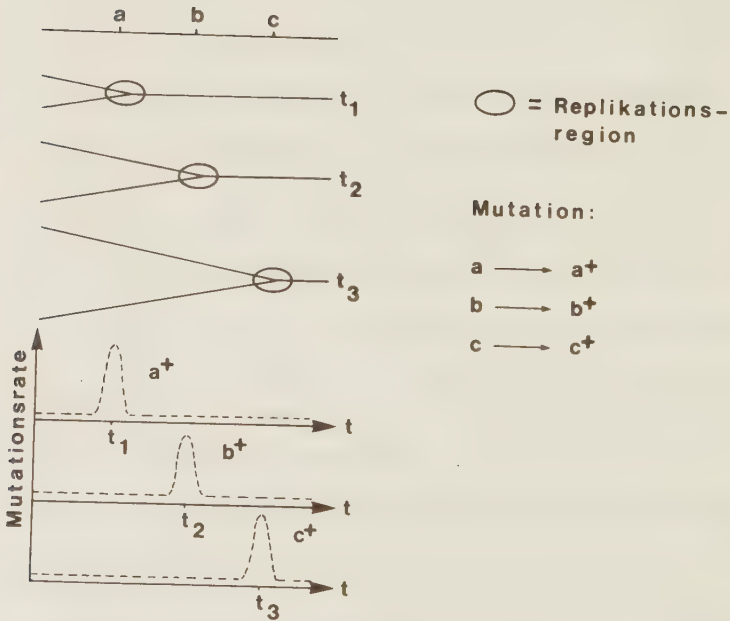


Abb. 1: Konzept der sequentiellen Mutagenese.
Weitere Erklärungen siehe Text.

4.2. Synchrones Wachstum von R.lupini Zellen

4.2.1. Die Methode der Nalidixinsäurebehandlung zur Synchronisierung von Bakterienzellen

Eine Hemmung des Proteinstoffwechsels in E.coli, hervorgerufen durch eine Aminosäureaushungerung, hält die Zellteilung an und verursacht nach Aufhebung der Inhibierung synchrone Vermehrung der Zellen (HILLIGER et al., 1974). Wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte, initiiert eine Aminosäureaushungerung auch synchrones Wachstum in R.lupini (JESSBERGER et al., 1974). Allerdings war die Synchronität noch nicht zufriedenstellend, so daß weitere Synchronisationsmethoden auf ihre Wirksamkeit geprüft werden sollten.

Im Gegensatz zur Aminosäureaushungerung, bei der in den Proteinstoffwechsel eingegriffen wird, kann bei E.coli die DNA-Synthese direkt beeinflusst werden (GOSS et al., 1965). Nalidixinsäure hemmt spezifisch die DNA-Replikation und führt nach Aufhebung der Inhibierung zur synchronen Initiierung der Chromosomenreplikation (WARD et al., 1970). Zur Prüfung dieses Effektes wurde sowohl bei E.coli als auch bei R.lupini der Nalidixinsäureeinfluß auf das Wachstum der Bakterien untersucht. Als Versuchsobjekte dienten der prototrophe E.coli Stamm K 12 (Wildtyp) und die

histidinauxotrophe R.lupini Mutante 1-20. Logarithmisch wachsende Zellkulturen beider Stämme wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Nalidixinsäure versetzt und das Wachstum der Zellen über eine optische Dichtemessung verfolgt. In den Abb. 2 und 3 ist das Wuchsverhalten unter Nalidixinsäureeinwirkung für E.coli bzw. R.lupini dargestellt. Das Wachstum der E.coli Zellen wird schon bei einer Nalidixinsäurekonzentration von 10 µg/ml nach kurzer Zeit total angehalten, so wie es von WARD und Mitarbeiter (1970) beschrieben wird (Abb. 2). Die R.lupini Zellen dagegen zeigen selbst bei einer Konzentration von 400 µg/ml Nalidixinsäure keine nennenswerte Wachstumsbeeinflussung (Abb. 3).

Eine erschwerte Aufnahme der Nalidixinsäure durch die Zelle auf Grund einer Permeabilitätsschranke könnte diese geringe Sensibilität der R.lupini Zellen erklären. Die Aufhebung einer solchen unspezifischen Permeabilitätsschranke bei R.lupini kann, wie für Trimetoprim beschrieben (MATTES, 1974), durch EDTA erfolgen. Nalidixinsäure zeigte nach EDTA-Behandlung der R.lupini Zellen aber keine stärkere Wachstums- hemmung (Abb. 4).

Daraus läßt sich schließen, daß die R.lupini Zelle keinen Angriffspunkt für Nalidixinsäure aufweist und

somit resistent gegen Nalidixinsäure ist, während E.coli sehr empfindlich gegen die Säure reagiert. Deshalb kann die bei E.coli so spezifische Wirkung von Nalidixinsäure nicht zur Synchronisierung von R.lupini Zellen herangezogen werden.

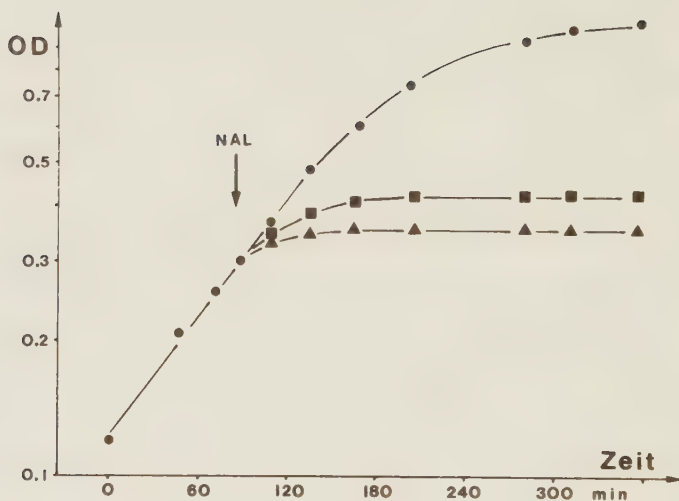


Abb. 2: Einfluß von Nalidixinsäure auf das Wachstum von E.coli.

Eine logarithmisch wachsende Kultur des E.coli Stammes K 12 (wt) wird mit 10 (■) und 50 (▲) µg/ml Nalidixinsäure behandelt und das Wachstum mit Hilfe der optischen Dichte-Messung verfolgt. Die Kontrolle (●) enthält keine Nalidixinsäure.

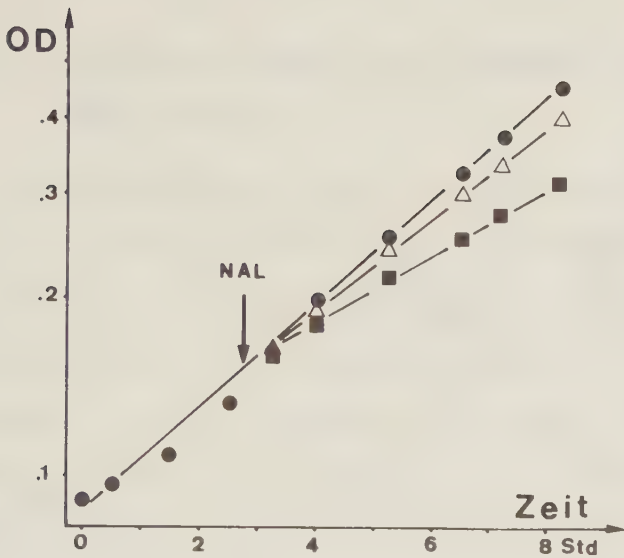


Abb. 3: Einfluß von Nalidixinsäure auf das Wachstum von R. lupini.

Eine logarithmisch wachsende Kultur des Stammes 1-20 (hisC) wird mit 50 (Δ) bzw. 400 (■) µg/ml Nalidixinsäure behandelt und die Dichtezunahme bei 580 nm gemessen. Die Kontrollsuspension (●) enthält keine Nalidixinsäure.

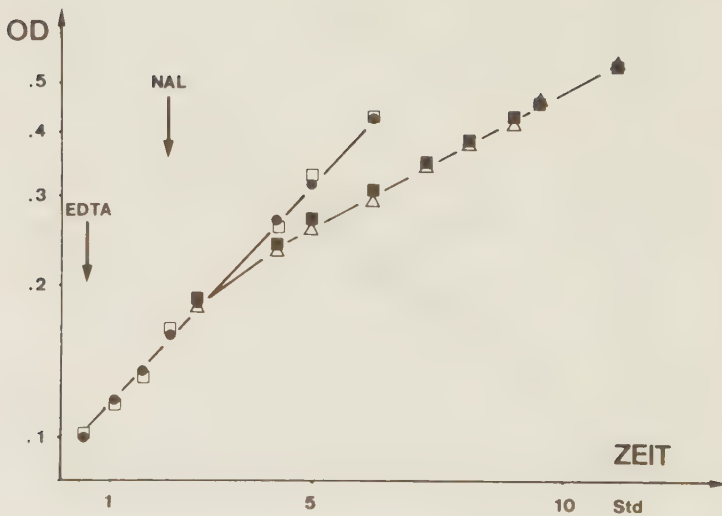


Abb. 4: Einfluß von Nalidixinsäure auf das Wachstum von R. lupini nach EDTA-Behandlung.

Eine Übernachtskultur von 1-20 (hisC) wird geteilt und zur einen Hälfte EDTA (100 mM) gegeben; die andere Hälfte bleibt unbehandelt. Nach 2 Std. wird zu beiden Kulturen Nalidixinsäure (200 µg/ml) gegeben.

Wachstum ohne EDTA ohne Nalidixinsäure (□)

Wachstum ohne EDTA mit Nalidixinsäure (△)

Wachstum mit EDTA ohne Nalidixinsäure (●)

Wachstum mit EDTA mit Nalidixinsäure (■)

4.2.2. Synchronisierung der R.lupini Zellen durch Isolierung gleichvolumiger Zellen

4.2.2.1. Sedimentationsanalyse der Bakterien im Sucrosegradient

Die bisher beschriebenen Synchronisationsmethoden, die auf einer Hemmung des metabolen Stoffwechsels in der Zelle beruhen, brachten bei R.lupini keinen befriedigenden Erfolg. So ergab eine Inhibierung der Proteinsynthese durch eine Aminosäureaushungerung nicht das gewünschte Ausmaß an Synchronität (JESSBERGER et al., 1974). Ebenso war eine Hemmung der DNA-Neusynthese mit Nalidixinsäure zur Initiierung des synchronen Wachstums in R.lupini nicht möglich, da R.lupini Zellen gegen Nalidixinsäure resistent reagierten.

HELMSTETTER (1964) und MITCHISON (1965) beschrieben nun jeweils eine Methode, synchrones Wachstum von Zellen zu erhalten, ohne in die biochemischen Abläufe der Zellen einzugreifen. Während HELMSTETTER Zellen isolierte, die sich gerade von Mutterzellen abtrennten (sog. "baby cells"), selektionierte MITCHISON gleichgroße Zellen durch Sedimentation. Das Verfahren der Zellalterselektion konnte bisher nur bei wenigen Bakterien Anwendung finden. Die Sedimentation im Sucrose-Dichte-Gradienten dagegen erlaubt es, bei

Pro- und Eukaryonten Zellen gleicher Größe zu separieren und mit ihnen synchrones Wachstum einzuleiten (MITCHISON et al., 1965; KUBITSCHKEK et al., 1967; HALVORSON et al., 1971; BRONK et al., 1974).

Zur Anwendung der letztgenannten Technik wurde zunächst das Sedimentationsverhalten der R. lupini Zellen im Sucrosegradient analysiert. Dabei zeigte sich, daß die Zellen der logarithmisch wachsenden R. lupini Kultur (1-20, hisC) nach 15 minütiger Zentrifugation im Sucrosegradient (5-20% w/w Sucrose) sich über den gesamten Gradienten verteilten, im mittleren Bereich jedoch stärker konzentrierten. Zur genaueren Analyse wurde der Gradient fraktioniert und mit dem Coulter Counter die Bakterienzahl der Fraktionen bestimmt, die aus dem Bereich der größten Bakteriendichte stammten (Abb. 5). Wie man sieht, sedimentieren nicht alle Zellen der logarithmisch wachsenden R. lupini Kultur mit gleicher Geschwindigkeit, so daß sich die Zellen über einen bestimmten Bereich des Sucrosegradienten verteilen. In den Fraktionen unter bzw. über der sichtbaren Bakterienbande befand sich eine so geringe Anzahl an Zellen, daß sie mit dem Coulter Counter nicht mehr exakt nachzuweisen war.

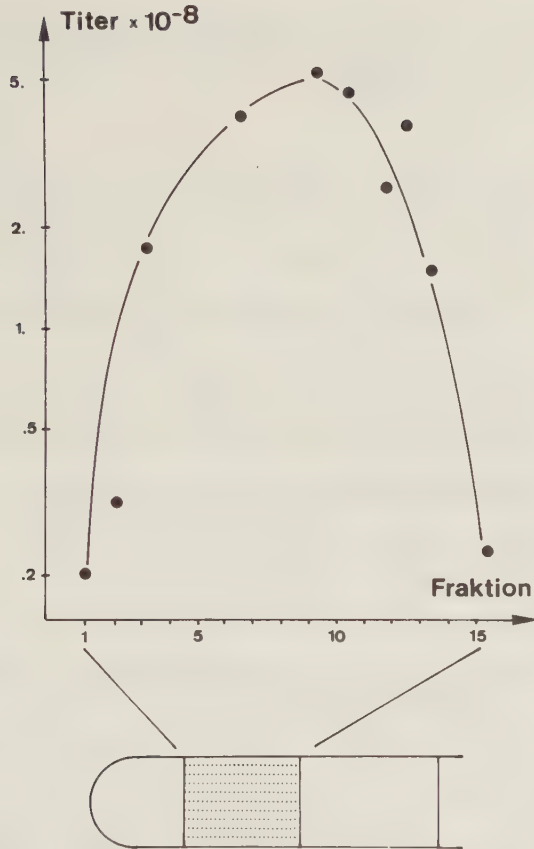


Abb. 5: Verteilung der R. lupini Zellen im Sucrosegradient.

Die Verteilung der logarithmisch wachsenden R. lupini Zellen (1-20, hisC) nach Zentrifugation (15 Min., 4 000 Upm) im Sucrosegradient (5-20% w/w) wurde durch Zellzahlbestimmung einzelner Fraktionen mit dem Coulter Counter ermittelt. Die Suspension mit der im Zentrifugenbecher sichtbaren Bakterienbande wurde fraktioniert. Die Zellzahl unter bzw. über der Bakterienbande war so gering, daß sie mit dem Coulter Counter nicht mehr bestimmt werden konnte.

4.2.2.2. Größenverteilung von R.lupini im Sucrose- gradient

Die in der Abb. 5 dargestellte Auftrennung der Bakterien einer logarithmisch wachsenden R.lupini Kultur in einem Sucrosegradient zeigt die Aufschlüsselung der Zellzahl in Abhängigkeit vom Sedimentationsverhalten. Mit der gleichen Methode läßt sich auch das Volumen der Zellen pro Fraktion bestimmen. Dazu wurde die mittlere Zellgrößenverteilung jeder Fraktion mit dem Analysiersystem des Coulter Counter gemessen. Ein Beispiel für eine typische Größenverteilung einer Bakterienprobe, wie sie vom Schreiber des Meßsystems ausgegeben wird, ist in Abb. 6 für die Zellen der obersten Fraktion des Sucrosegradient dargestellt.

Vergleicht man die Größenverteilung jeder Fraktion miteinander, so zeigt es sich, daß sich die Zellen gemäß ihrer Größe im Sucrosegradient verteilt haben (Abb. 7). Die Zellen mit dem größten Volumen sedimentieren am schnellsten (größter s-Wert) und befinden sich am Boden des Zentrifugenbechers, während die kleinsten Zellen sich im oberen Abschnitt aufhalten. Der kontinuierliche Verlauf der Kurve macht deutlich, daß die Zellen einer R.lupini Population in einem Sucrosegradient nach ihrem jeweiligen Volumen aufgetrennt werden.



Abb. 6: Größenverteilung von R. lupini Zellen.

Die Größenverteilung der kleinsten R. lupini Zellen von 1-20 (hisC), - entspricht Fraktion 13 der Abb. 5 - selektioniert nach Sucrose-gradientenzentrifugation wurde mit dem Coulter Counter und dem Größenanalysator gemessen.

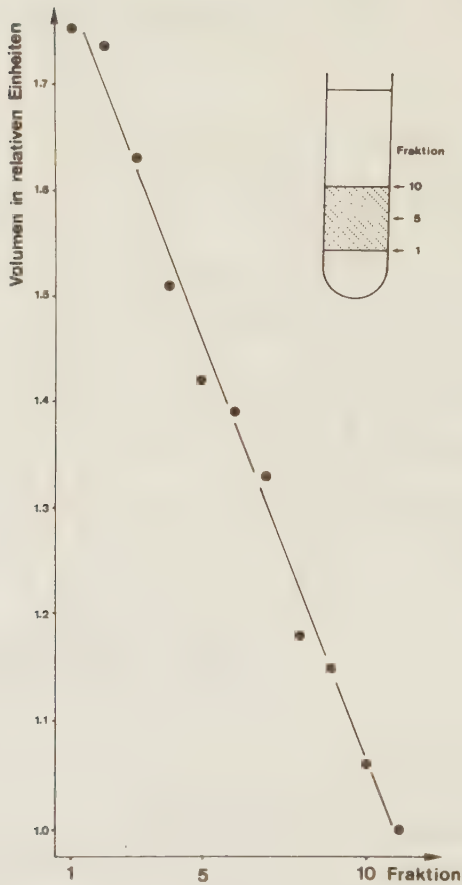


Abb. 7: Volumenverteilung von R. lupini Zellen im Sucrosegradient.

Die Fraktionierung erfolgte nach 15 minütiger Zentrifugation bei 3 000 Upm des linearen Sucrosegradienten (5-20% w/w) ab unterem Ende der Bakterienbande durch Absaugen der Zellen mit einer Kapillare. Die Bestimmung des häufigsten Zellvolumens der einzelnen Fraktionen wurde mit dem Größenanalysator durchgeführt.

4.2.2.3. Synchrones Verhalten der kleinen Zellen in Flüssigmedium

Eine logarithmisch wachsende R.lupini Kultur wird wie oben beschrieben in einem Sucrosegradient nach der Zellgröße aufgetrennt und die Fraktion mit den kleinen Zellen entnommen. Nach Überimpfung dieser Zellen in frisches Medium werden aus dieser Zellkultur in bestimmten Zeitabständen Proben zur optischen Dichtemessung und Volumenbestimmung entnommen. In Abb. 8 sind einige zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommenen Größenspektren zusammengefaßt. Zur besseren Übersicht wurden nur die Spitzen der Spektren aufgezeichnet. Wie man deutlich erkennen kann, variiert die Lage der jeweiligen Spitze (projiziert auf die Ordinate) in einer bestimmten Regelmäßigkeit. Diese periodische Veränderung wurde in Abb. 9 graphisch dargestellt. Hierzu wurde das häufigste Volumen der synchronisierten R.lupini Kultur gegen die Zeit der jeweiligen Probenentnahme aufgetragen. Aus der Abbildung ersieht man, daß das Volumen der kleinsten Zellen nach Überimpfen in MM+CAA ansteigt und nach Erreichen eines Maximalwertes abnimmt, um anschließend einen erneuten Zyklus zu durchlaufen. Geht man von der Tatsache aus, daß logarithmisch wachsende Zellen, die nicht der Synchronisierung unterworfen wurden, keine synchronen Volumenschwankungen aufwei-

sen, so zeigen diese Ergebnisse synchrones Wachstum an. Somit läßt sich aus dem Abstand der Volumenhöchstwerte der gemittelte Teilungsrhythmus der Zellen bestimmen, da die Maxima die Zeitpunkte wiedergeben, an denen sich die Kultur jeweils zu teilen beginnt.

4.2.2.4. Synchrones Wachstum von kleinen und großen Zellen aus dem Sucrosegradient

Wie oben beschrieben wurde durch Selektion der kleinsten Zellen einer R. lupini Population synchrones Wachstum hervorgerufen. Dies ist jedoch nicht nur auf die kleinen Zellen beschränkt; denn eine Isolierung der größten Zellen in einem Sucrosegradienten führt ebenso zum synchronen Verhalten der R. lupini Kultur. Abb. 10 zeigt, daß das Volumen der großen Bakterien kurz nach Inkubation abfällt, um erst anschließend anzusteigen. Dies bedeutet, daß sich im unteren Teil der Bakterienbande im Sucrosegradient die Zellen aufhalten, die kurz vor der Zellteilung stehen und damit das größte Volumen besitzen.

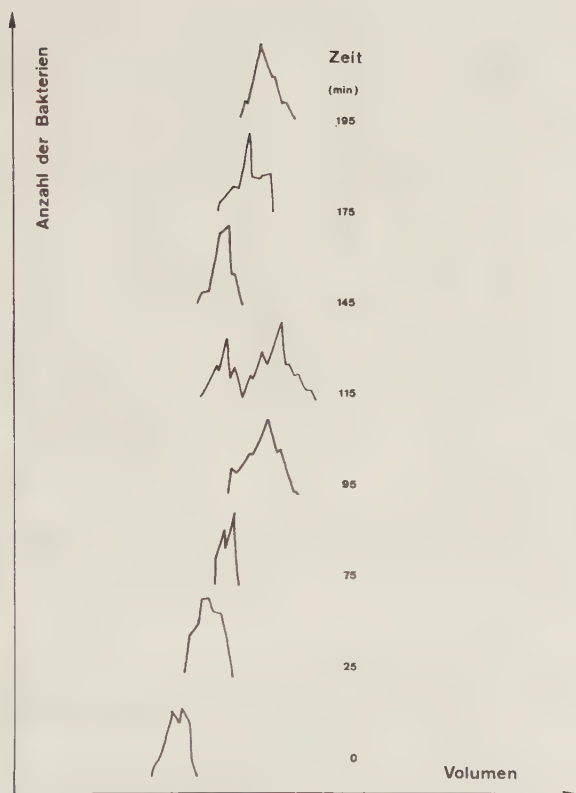


Abb. 8: Zeitliche Verschiebung des Größenspektrums von synchronisierten R. lupini Zellen.

Die Synchronisierung erfolgte durch Selektion der kleinsten Zellen nach Sucrosegradientenzentrifugation und Überimpfen der Zellen in Nährmedium (NB). Die Zellgröße wurde mit dem Coulter Counter und dem Größenanalysator gemessen. Zur besseren Übersicht wurden nur die Spitzen der Größenverteilungsspektren aufgezeichnet.

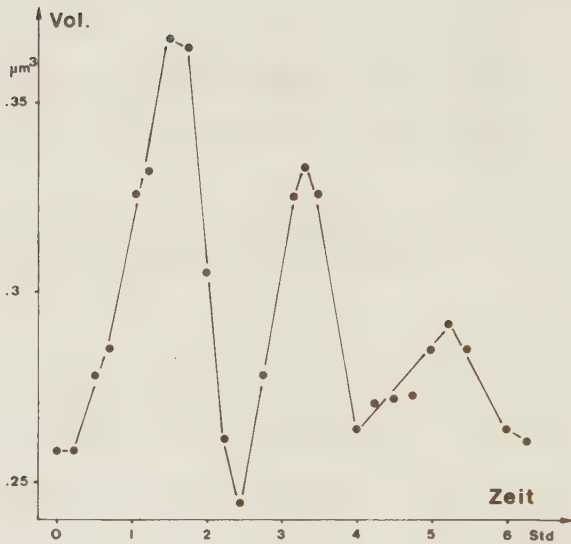


Abb. 9: Synchrones Wachstum einer R. lupini Kultur im synthetischen Vollmedium.

Nach Selektion der kleinsten Zellen der logarithmisch wachsenden Kultur (1-20, hisC) im Sucrosegradient und Überimpfen der Zellen in Nährmedium (MM+CAA) wurde das mittlere Volumen der Zellen mit dem Coulter Counter und dem Größenanalysator bestimmt.

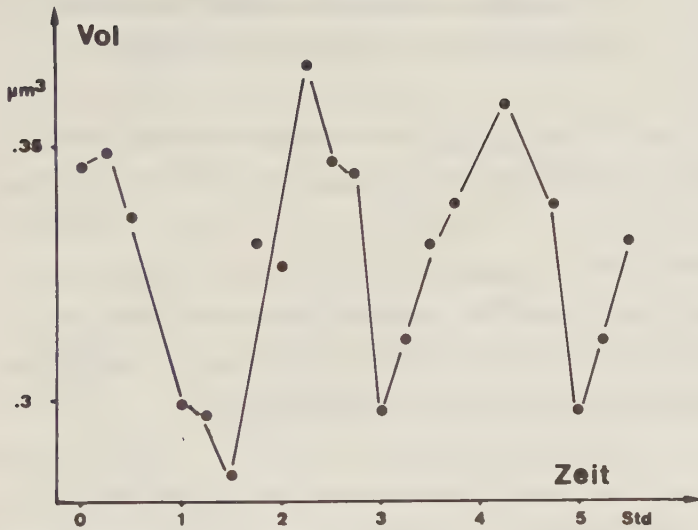


Abb. 10: Synchrones Wachstum einer R. lupini Kultur in synthetischem Vollmedium.

Nach Selektion der größten Zellen von R. lupini 1-20 (hisC) im Sucrosegradient und Überimpfen der Zellen in Nährmedium (MM+CAA) wurde das mittlere Volumen der Zellen bestimmt.

4.2.2.5. Vergleichende Synchronisation von E.coli
und R.lupini Zellen nach Größenselektion
im Sucrose- und im Ficoll-Gradienten

Zur Überprüfung des Synchronisationsnachweises wurden bekannte Experimente mit E.coli nachvollzogen (WARD et al., 1970; KUBITSCHKE, 1969). Eine Blockierung der DNA-Synthese in E.coli Zellen durch eine Nalidixinsäure Behandlung führt nach Entfernen der Säure zu ähnlichen Volumenänderungen der Zellen, wie sie bei R.lupini gezeigt werden konnten (Abb. 11).

Im Gegensatz hierzu und im Vergleich zu den Ergebnissen bei R.lupini ließ sich bei E.coli der Nachweis der Synchronisation anhand von Volumenmessungen nicht erbringen, wenn synchrones Wachstum durch Selektion der kleinen Zellen im Sucrosegradient induziert wurde (Abb. 12 A). Die Größe der E.coli Zellen nahm kontinuierlich zu, ohne periodisch auf ihren Ausgangswert zu sinken. Betrachtet man den Absolutwert der kleinsten E.coli Zellen in diesem Versuch, so stellt man fest, daß das Volumen im Vergleich zu anderen Messungen mit $0.65 \mu\text{m}^3$ für E.coli zu gering ist. Der Normalwert liegt zwischen $0.8 - 1.0 \mu\text{m}^3$. Diese Volumenverkleinerung kann auf die osmotische Wirkung der hohen Sucrosekonzentration (ca. 15%) zurückzuführen sein. Bestätigung findet diese Überlegung in den Abb. 12B

und 13. In Abb. 12 B wurde das Wachstum derselben Kultur durch Zellzahlbestimmung überwacht. Der stufenförmige Verlauf der Kurve macht die synchrone Teilung der Zellen deutlich. Abb. 13 zeigt die zeitliche Volumenänderung einer synchronisierten E.coli Kultur nach Selektion der kleinen Zellen im Ficollgradient.

Ficoll ist die Firmenbezeichnung für ein polymolekulares, neutrales Kolloid mit Polysaccharideigenschaften (HOLTER et al., 1958). Durch die Verwendung der osmotisch inaktiven Substanz wird die starke osmotische Wirkung von Sucrose auf E.coli Zellen umgangen und so die Schrumpfung der Bakterien verhindert. Die Größe der Zellen bleibt in Ficoll erhalten, so daß eine Überführung der kleinen Zellen von Ficoll in Flüssigmedium nur das Wachstum, nicht aber das osmotische Verhalten beeinflußt. Auf diese Weise kann man das synchrone Wachstum von E.coli Zellen nach Selektion der kleinen Zellen auch anhand der Volumenmessung verfolgen (Abb. 13).

Diese Überlegungen müssen für R.lupini nicht angestellt werden, da die R.lupini Zellen gegen osmotische Schwankungen nicht so empfindlich reagieren wie E.coli Zellen. So zeigen R.lupini Zellen sowohl in Wasser als auch in 20%-iger Sucroslösung keine Volumenveränderung. Auf Grund dieser Tatsache er-

folgten die weiteren Versuche zur Selektion einer bestimmten Zellgröße von R. lupini im Sucrosegradient.

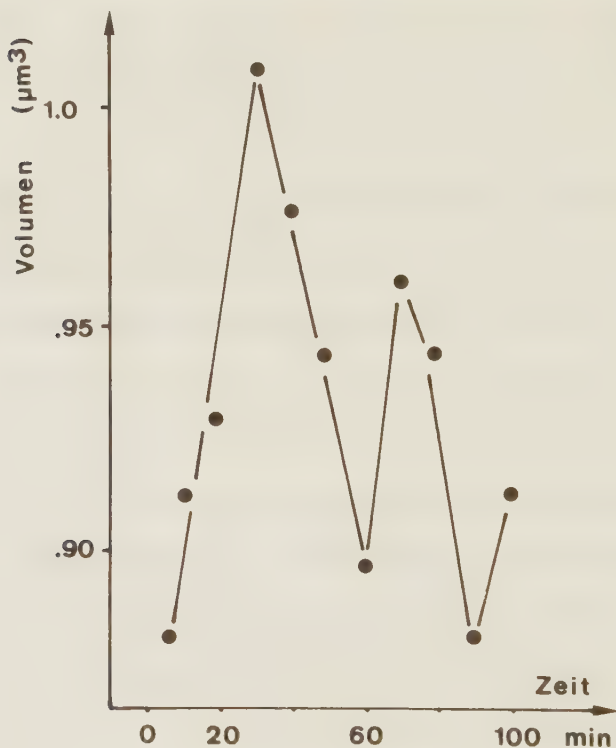


Abb. 11: Synchronisation von E. coli Zellen nach Nalidixinsäurebehandlung.

Nach 60 minütiger Einwirkung von 10 µg/ml Nalidixinsäure wurden die Zellen zentrifugiert und in MM ohne Glucose-Zusatz gewaschen. Nach Resuspendieren der Zellen in MM mit Glucose wurde das mittlere Volumen der Zellen mit dem Coulter Counter und dem Größenanalysator bestimmt.

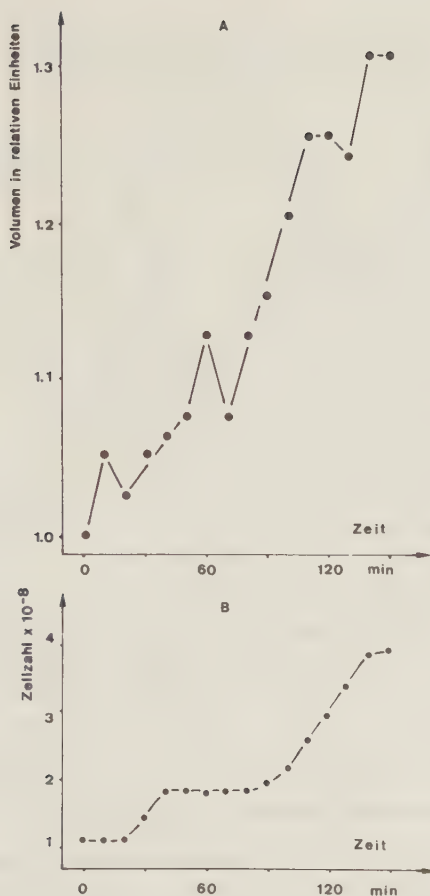


Abb. 12: Synchrones Wachstum von E. coli Zellen nach Selektion der kleinsten Zellen im Sucrosegradienten.

A: Volumenbestimmung der Zellen (E. coli K 12, wt) nach Überimpfen in supplementiertes MM.
 B: Zellzahlbestimmung.

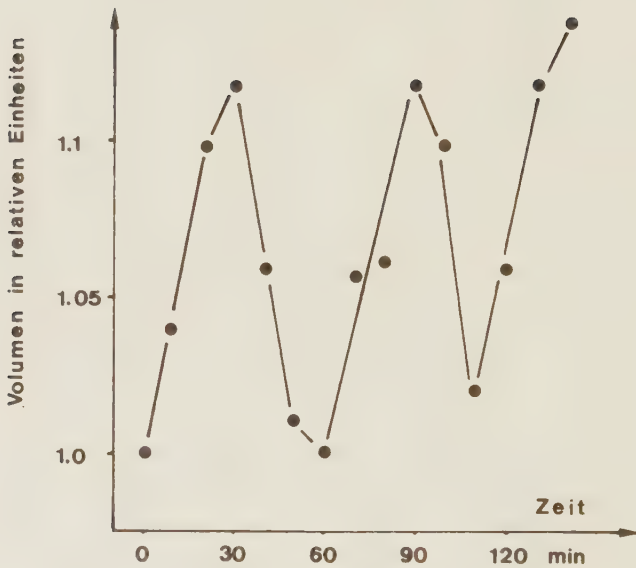


Abb. 13: Synchrones Wachstum von E.coli Zellen nach Größenselektion im Ficollgradienten.

Logarithmisch wachsende E.coli Zellen (K 12, wt) wurden im Ficollgradient (2-12% w/w Ficoll) 20 Min. bei 2 000 Upm zentrifugiert. Die obersten Fraktionen der sichtbaren Bakterienbande wurden in MM gegeben und das mittlere Zellvolumen der Bakteriensuspension mit dem Größenanalysator bestimmt.

4.3. Sequentielle Mutagenese in R.lupini

4.3.1. Auswahl geeigneter Mutanten

Das Verfahren der sequentiellen Mutagenese setzt die Möglichkeit zur Synchronisierung der Bakterien und die Mutierbarkeit durch NTG voraus (siehe 4.1.). Wie oben gezeigt werden konnte, lassen sich R.lupini Zellen mit der Technik der Größenselektionierung gut synchronisieren. Die optimalen Bedingungen für eine NTG-Mutagenese wurden am R.lupini Stamm 1-20 (hisC) erarbeitet (JESSBERGER, 1973).

Schnelle und einfache Selektion von Mutanten, wie sie für die sequentielle Mutagenese gefordert wird, erreicht man durch Mutation von auxotrophen und antibiotikasensitiven Bakterien zu Prototrophie bzw. Antibiotikaresistenz; denn auf geeigneten Selektivmedien wie Minimalagar- oder antibiotikahaltige Vollmediumagar-Platten können nur die mutierten Zellen wachsen. Da aber nicht alle Mutationen durch NTG revertierbar sind, muß nach Mutanten gesucht werden, die sich durch NTG leicht rückmutieren lassen.

Zur Auswahl solcher Mutanten standen die Bakterien der Stammsammlung des Instituts zur Verfügung, wobei Bakterien ohne Sternbildung bevorzugt wurden. Denn Bak-

teriensterne, die aus einem Aggregat mehrerer fest miteinander verbundenen Einzelzellen bestehen (HEUMANN, 1968), verfälschen die Meßwerte der Volumenbestimmungen. Da ein Stern vom Coulter Counter als ein Partikel gezählt wird, dessen Volumen einem Vielfachen der Einzelzelle entspricht, hätte dies eine scheinbare Volumenvergrößerung der Zellen mit gleichzeitiger Verringerung der Partikelanzahl zur Folge. Ein Synchronisationsnachweis mit Hilfe der Volumenbestimmung ist somit bei sternbildenden Bakterien schwer möglich. Aus diesem Grund wurden nur sta^- -Mutanten verwendet.

In Abb. 14 ist als Beispiel die durch NTG induzierte Rückmutation einer auxotrophen Markierung (1-58, *metA*) dargestellt. In diesem Versuch wurde eine MM-Agar-Platte mit 1-58 (*metA*) dicht beimpft und mit einem NTG-Kristall versehen. Dieser NTG-Kristall erzeugte einen radialen Diffusionsgradienten, wobei in seiner näheren Umgebung alle Bakterien abgetötet wurden. Erst ab einer bestimmten NTG-Konzentration entstanden lebensfähige Revertanten, die auf dem verwendeten MM-Agar innerhalb von 8 Tagen zu Kolonien aufwuchsen. Die Rückmutabilität durch NTG verdeutlicht sich in der ringförmigen Anordnung der Kolonien auf einer Platte, während ein Fehlen der NTG-Induzierbarkeit keine oder nur vereinzelt auftretende Kolonien aufkommen ließ. Von ca. 60 getesteten Stämmen waren nur

die in Tab. I aufgeführten auxotrophen Mutanten durch NTG rückmutierbar.

Im Anschluß daran wurde untersucht, ob NTG auch Antibiotikaresistenzen in den ausgewählten sensitiven Mutanten induziert. Mit der oben geschilderten Methode (NTG-Diffusion) konnten keine Antibiotikaresistenzen erhalten werden, da die Bakterien zur Ausprägung des Phänotyps (= Resistenz) ein mutagenfreies Medium benötigen. Deshalb wurden die zu untersuchenden Zellen einer NTG-Mutagenese unterzogen, bei der die Einwirkungszeit von NTG auf 5 Min. begrenzt wurde. Nach einer zwölf stündigen Inkubation in MM+CAA-Zusatz wurden die Bakterien auf antibiotikahaltigen NB-Agarplatten angezogen. Das Ergebnis für verschiedene NTG-Konzentrationen ist in Abb. 15 dargestellt.

Wie man aus den Werten der Mutationsrate zur Prototrophie sieht, läßt sich der Stamm in dem Konzentrationsbereich von 10-100 $\mu\text{g/ml}$ NTG gut mutieren. Dasselbe gilt für die Induktion von Antibiotikaresistenzen, wobei auffällt, daß eine optimale Mutationsrate mit 50 $\mu\text{g/ml}$ NTG erreicht wird. Diese NTG-Konzentration wird bei der unten beschriebenen sequentiellen Mutagenese verwendet. Alle getesteten Bakterien ließen sich durch NTG zur Ausbildung der Antibiotikaresistenzen induzieren; ausgenommen sind die Stämme,

die entweder gegen ein Antibiotikum unempfindlich sind (z.B. Stamm 1-311) oder eine sehr hohe Spontanmutationsrate besitzen, so daß die NTG-Wirkung nicht sichtbar wird (z.B. Stamm 1-297).



Abb. 14: Mutagene Wirkung von NTG auf R. lupini.

Rückmutation des Methionin auxotrophen Stammes (1-58). Ein Rasen von R. lupini Zellen wurde mit einem NTG-Kristall in der Mitte der MM-Agarplatte versehen. Wachstum der prototrophen Zellen zu sichtbaren Kolonien nach ca. 8-10 Tagen.

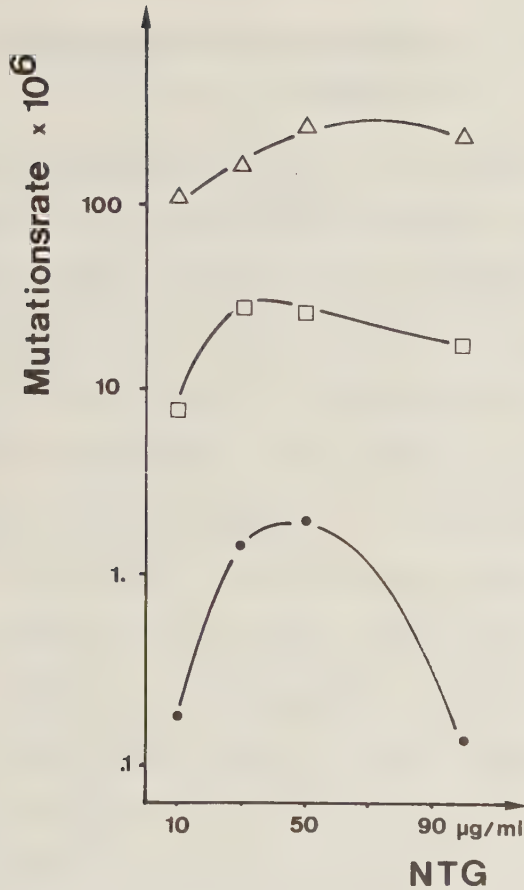


Abb. 15: NTG-Mutagenese der R. lupini Mutante 1-20 (hisC).

Die Mutationsrate nach NTG-Behandlung von R. lupini Zellen ist für die Genmarkierungen his (●), str (□) und kan (Δ) aufgetragen. Nach 5-minütiger Einwirkungszeit verschiedener NTG-Konzentrationen (10, 30, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$) wurden die behandelten Zellen zentrifugiert, gewaschen und in MM mit CAA-Zusatz für 3-4 Generationen bebrütet. Durch Überimpfen der Zellen auf die jeweiligen Selektivmediumagarplatten konnten nach ca. 8-10 Tagen die Mutantenkolonien pro Platte ausgezählt werden.

4.3.2. Versuchsaufbau zur sequentiellen Mutagenese

Die verschiedenen Schritte zur Ausführung der sequentiellen Mutagenese sind in Abb. 16 zusammengefaßt. Die R.lupini Zellen werden zunächst durch die Sortierung in Größenklassen synchronisiert. Dazu selektiert man die kleinsten Zellen einer Übernachtskultur nach einer Sucrosegradientenzentrifugation und überimpft sie in MM mit dem entsprechenden Supplement (vergleiche 4.2.2.3.). Während der Inkubation bei 30°C und Belüftung im Schüttelwasserbad wurde über einen Zeitraum von mindestens zwei Generationen (7-8 Stunden) das Volumen der Zellen und die optische Dichte der Bakteriensuspension gemessen und Mutagenesepulse mit NTG gegeben. Ein Beispiel für das Ergebnis einer Volumenbestimmung ist in Abb. 9, die Meßwerte der optischen Dichte in Abb. 17 dargestellt. Die NTG-Mutagenese, die alle 20 Minuten erfolgte, wurde wie in Material und Methoden beschrieben ausgeführt.

Bei der Berechnung der Mutationsrate konnte festgestellt werden, daß diese in R.lupini um den Faktor 1 000 geringer ist als in E.coli. Aus diesem Grund mußte versucht werden, möglichst viele Zellen zu mutieren, um anschließend eine genügend hohe Mutantenzahl zu erreichen. Deshalb wurde die NTG-Behand-

lung nicht wie bei E.coli durch eine Verdünnung (HOHLFELD et al., 1973; VIELMETTER et al., 1968), sondern durch eine Filtration mit Waschen und Resuspendieren der Zellen in Wasser unterbrochen. Auf diese Weise konnten ca. 10^7 überlebende Zellen erhalten werden. Zur Berechnung der Mutationsrate, die das Verhältnis von Mutanten- zu Überlebenszahl wiedergibt, bedarf es der Ermittlung der die Mutagenese überlebenden Bakterien. Hierfür wurden Aliquots der Zellen jeder Probe auf Vollmedium-Agar-Platten überimpft und nach zwei Tagen anhand der entstandenen Kolonien pro Platte die Bakterienzahl pro ml berechnet. Zeit zur Ausprägung des Phänotyps erhielten die mutierten Zellen während der Inkubation über Nacht in MM+CAA. Durch Verteilen der Zellen auf Selektivmedien wie MM für Prototrophie-Mutanten, NB+Kan für Kanamycinresistenz- und NB+Str für Streptomycinresistenzmutationen wurde die Mutantenzahl pro ml und Probe ermittelt. Die Werte der berechneten Mutationsrate, der Zellvolumina und der optischen Dichtemessung wurden für jede Probe jeweils in ein Diagramm gezeichnet. Die Auswertung der Mutationsrate wurde unten beschrieben.

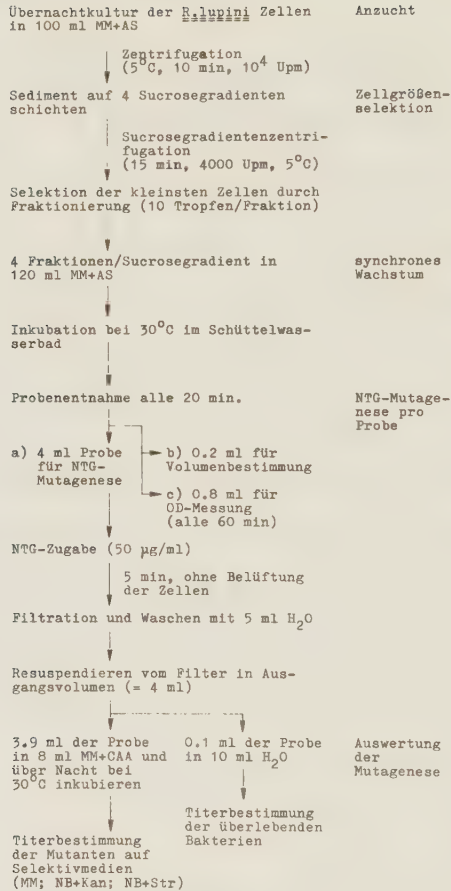


Abb. 16: Versuchsaufbau zur sequentiellen Mutagenese.
Weitere Erklärungen siehe Text.

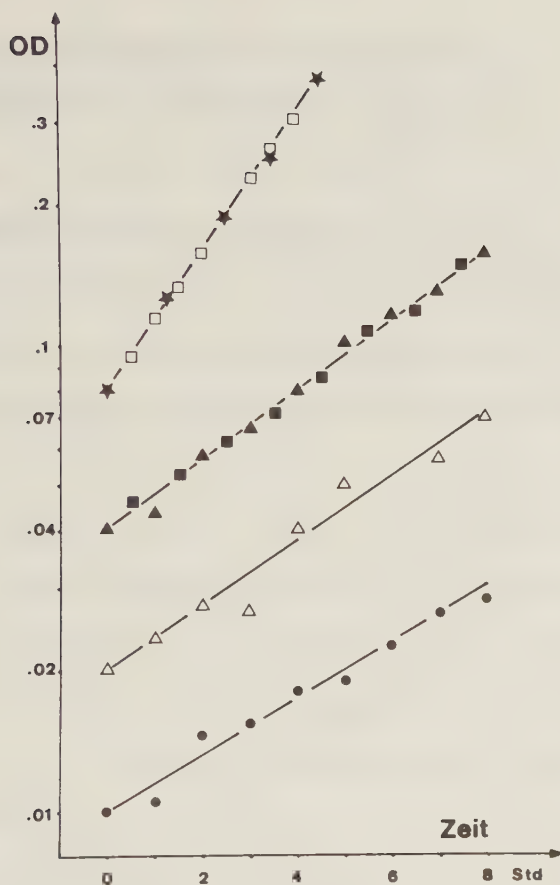


Abb. 17: Wachstum von synchronisierten R. lupini Zellen.

Das Wachstum verschiedener R. lupini Mutanten in Voll- bzw. Minimalmedium wurde durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Zur besseren Übersicht wurden die Werte der OD mit konstanten Faktoren multipliziert.

- 1-20 (hisC) in MM+CAA (Generationszeit: 120') (□)
- 1-58 (metA) in MM+CAA (Generationszeit: 120') (★)
- 1-20 (hisC) in MM+His (Generationszeit: 240') (▲)
- 1-297 (argA) in MM+Arg (Generationszeit: 240') (■)
- 1-311 (cysE) in MM+Cys (Generationszeit: 260') (△)
- 1-513 (ilvB) in MM+Ilv (Generationszeit: 300') (●)

4.3.3. Veränderung der Mutationsrate während
der NTG-Behandlung einer synchronisier-
ten Kultur

Bisher wurde die Möglichkeit der Synchronisierung von R.lupini Zellen über eine ZellgröÙenselektion aufgezeigt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß sich mit NTG auxotrophe Mutationen zur Prototrophie mutieren und Antibiotikaresistenzen induzieren lassen. Eine Zusammenfassung beider Methoden ermöglicht die Anwendung der sequentiellen Mutagenese bei R.lupini. In Abb. 18 ist das Ergebnis der NTG-Behandlung des synchron wachsenden Stammes 1-311 (siehe Tab. I) mit einem genetischen Defekt in der Cysteinbiosynthese dargestellt. Die jeweilige Mutationsrate wurde durch successive NTG-Pulse einzelner Proben einer synchronisierten Kultur mit anschließender Inkubation von drei bis vier Generationszeiten in supplementiertem Minimalmedium zur Ausprägung des Phänotyps erhalten. Diese Mutationshäufigkeit wurde gegen die Zeit der jeweiligen NTG-Pulse nach Beginn des synchronen Wachstums aufgetragen.

Es fällt auf, daß die Frequenz der Mutation von cys-Auxotrophie zur Prototrophie zu bestimmten Zeiten des synchronen Wachstums einen Maximalwert erreicht.

Dieselben Ergebnisse wurden auch für andere chromosomale Markierungen gefunden. So zeigen die Stämme 1-20, 1-58, 1-297 und 1-513 mit den in Tab. I aufgeführten genetischen Defekten ein ähnliches Verteilungsmuster der Mutationshäufigkeit (Abb. 19 und 20). Auch für die Resistenzgene *str* (Streptomycin) und *kan* (Kanamycin), die bei fast allen Versuchen mitgetestet wurden, konnte ein Anstieg der Mutationsrate zu bestimmten Zeiten gemessen werden. Ein Beispiel ist in Abb. 21 dargestellt.

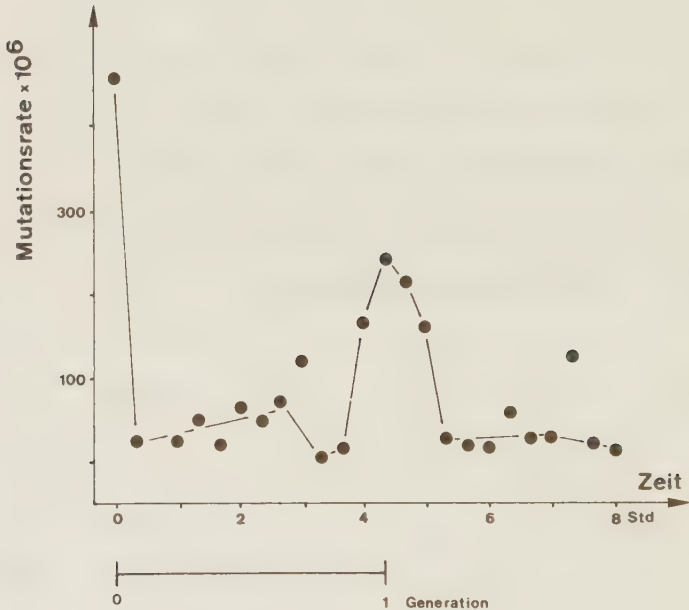


Abb. 18: Sequentielle Mutagenese in R. lupini.

Die Mutationshäufigkeit nach NTG-Behandlung der synchron wachsenden R. lupini Zellen (1-311) wurde für Cystein Revertanten bestimmt. Proben wurden alle 20 Min. einer synchronisierten Kultur entnommen, mit 50 $\mu\text{g/ml}$ NTG behandelt und auf cys Prototrophie untersucht.

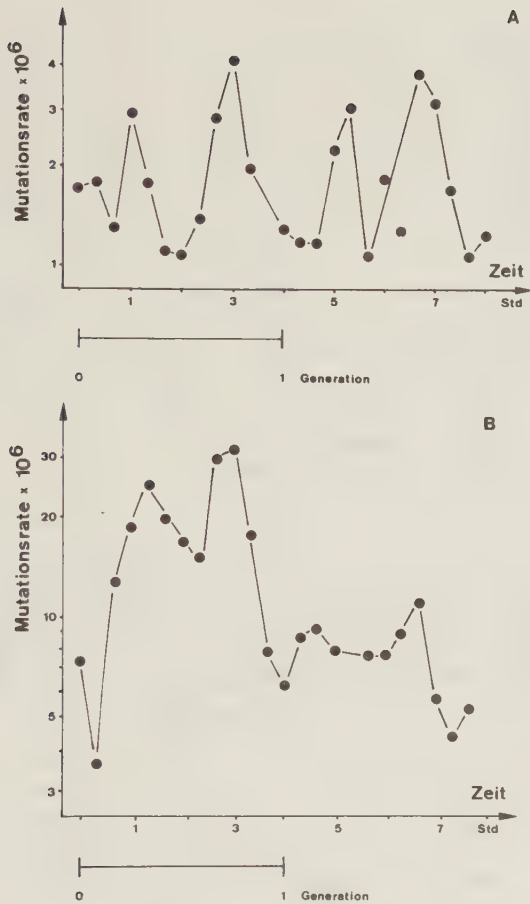


Abb. 19: Sequentielle Mutagenese in R. lupini.

Die Mutationshäufigkeit nach NTG-Behandlung der synchron wachsenden R. lupini Zellen wurde für

A: Arginin Revertanten von 1-297 (argA)

B: Histidin Revertanten von 1-20 (hisC)

bestimmt. Bedingungen wie im Methodenteil beschrieben.

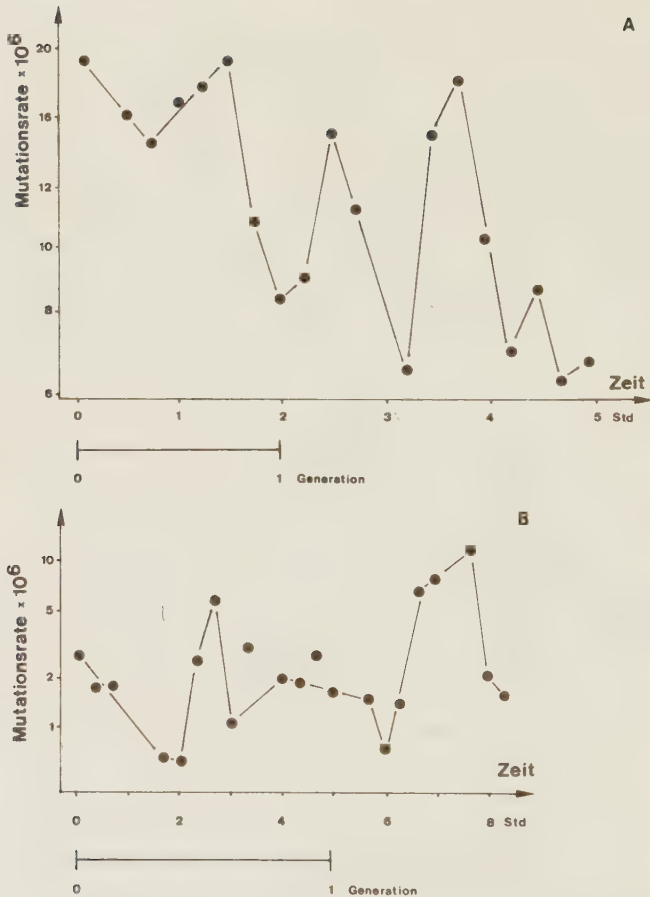


Abb. 20: Sequentielle Mutagenese in R. lupini.

Die Mutationshäufigkeit nach NTG-Behandlung der synchron wachsenden R. lupini Zellen wurde für

A: Methionin Revertanten von 1-58 (metA)

B: Isoleucin-Valin Revertanten von 1-513 (ilvB) bestimmt. Bedingungen wie im Methodenteil beschrieben.

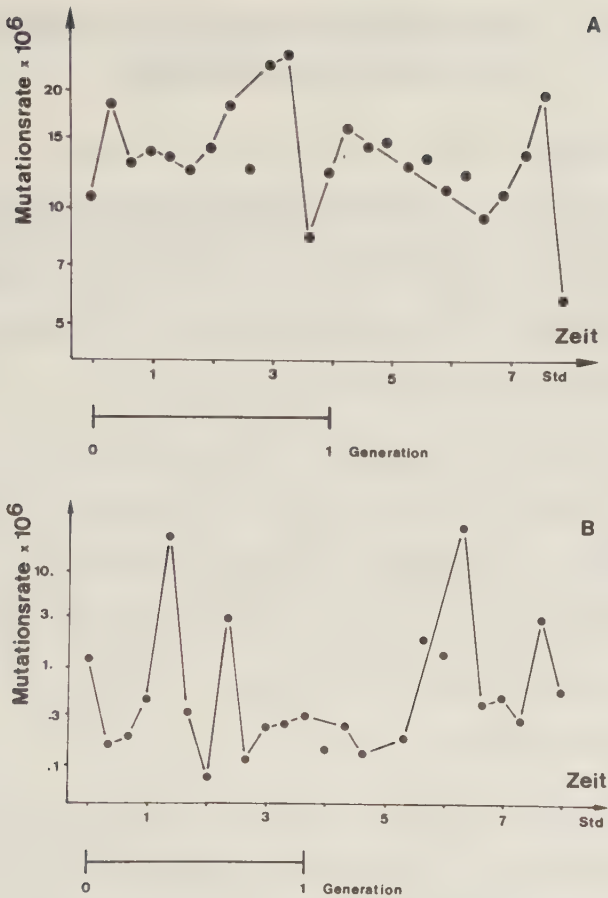


Abb. 21: Sequentielle Mutagenese in R. lupini.

Die Mutationshäufigkeit nach NTG-Behandlung der synchron wachsenden R. lupini Zellen (1-20, hisC) zur

A: Kanamycin Resistenz

B: Streptomycin Resistenz wurde aufgezeichnet.

Proben wurden alle 20 Min. von einer synchronisierten Kultur entnommen, mit NTG behandelt und auf Antibiotika Resistenz untersucht.

4.3.4. Zeitlicher Vergleich der Mutationsraten verschiedener Genmarkierungen

Zum besseren Vergleich der Ergebnisse wurden die Zeitangaben für die Maximalwerte der Mutationsrate als Bruchteile der Generationszeit angegeben (Tab. II). Die Generationszeit wurde durch optische Dichte-Messung (Abb. 17) und Volumenbestimmung der synchronisierten Zellen ermittelt.

Dabei zeigt es sich, daß die Mutationshäufigkeit für verschiedene Markierungen zu unterschiedlichen Zeiten ihren Maximalwert erreicht, während sie für jeweils dieselbe Markierung einen nahezu konstanten Zeitwert besitzt (Tab. II). Eine Ausnahme bilden die Markierungen met und arg, die zur gleichen Zeit ein Maximum aufweisen.

Ein Vergleich der Anzahl der Maxima pro Markierung mit der Zahl der Generationen ergibt bei den meisten Mutanten zwei Maxima, lediglich bei cys und ilv eines pro Generation. Diese Abweichung wird in der Diskussion behandelt.

Abb.	Markierung	Maximum	Zahl der Versuche								MW
			1	2	3	4	5	6	7	8	
18	cys	1.	-	-	-	-	-	0.00	-	-	0.00
		2.	-	-	-	-	-	1.00	-	-	1.00
19A	arg	1.	-	-	-	-	-	-	-	0.25	0.25
		2.	-	-	-	-	-	-	-	0.75	0.75
19B	his	1.	-	0.17	0.15	-	0.33	-	-	-	0.22
		2.	0.88	0.83	0.75	-	0.67	-	-	-	0.78
20A	met	1.	-	-	-	0.25	-	-	-	-	0.25
		2.	-	-	-	0.75	-	-	-	-	0.75
20B	ilv	1.	-	-	-	-	-	-	0.53	-	0.53
		2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21A	kan	1.	0.12	0.17	0.10	-	0.08	-	0.07	-	0.11
		2.	0.88	0.83	0.90	-	0.92	-	0.92	-	0.88
21B	str	1.	0.38	0.33	0.35	0.25	0.33	-	0.27	-	0.32
		2.	-	0.67	-	0.75	0.60	-	0.64	-	0.67

Tab. II: Sequentielle Mutagenese in R. lupini.

Zusammenfassung der Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese, die in den Abb. 18-21 dargestellt sind. Die Werte geben den Quotient aus der Zeit des Auftretens des 1. bzw. 2. Maximums der Mutationshäufigkeit zur Generationszeit der jeweiligen R. lupini Mutante wieder (MW = Mittelwert).

4.3.5. Aufstellung einer Replikationskarte nach dem zeitlichen Auftreten der Mutationsmaxima

In E.coli konnte nachgewiesen werden, daß die Wirkung von NTG besonders in der Region um den Replikationspunkt des Chromosoms liegt. Es werden hier ca. 80 % der Mutanten um den Wachstumspunkt des Chromosoms induziert (CERDA-OLMEDO et al., 1968; BOTSTEIN et al., 1969). Die Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese in R.lupini und frühere Überlegungen (JESSBERGER et al., 1974) lassen die Annahme zu, daß auch das R.lupini Chromosom in der Replikationsregion durch NTG effizienter mutiert wird als an anderen Chromosomenabschnitten (siehe Diskussion).

Auf Grund dieser NTG-Wirkung scheint es gerechtfertigt, die Maxima der Mutationsfrequenz für die verschiedenen Markierungen als Sequenz zu ordnen. In Abb. 22 ist ein lineares Chromosom als Gerade mit den Genmarkierungen dargestellt. Die Reihenfolge und die Abstände entsprechen der zeitlichen Sequenz der Mutationsratenspitzen. Außer den Markierungen cys und ilv sind jeweils zwei Punkte als mögliche Genorte gemäß den Ergebnissen der Tab. II angegeben. Außerdem fällt auf, daß die Markierungen met und arg zeitlich zusammenfallen, d.h. daß sie zur gleichen

Zeit repliziert werden. Zur Deutung dieser Ergebnisse wird auf die Diskussion verwiesen.

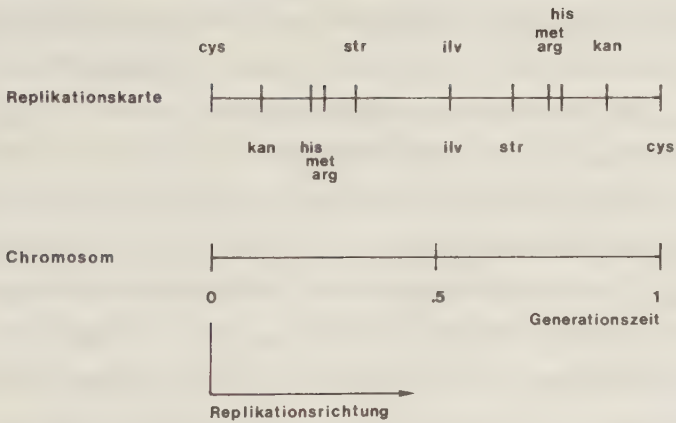


Abb. 22: Replikationskarte des *R. lupini* Chromosoms.

Die Replikationskarte wurde nach den Daten der Tab. II erstellt. Weitere Erklärungen siehe Text.

5. Diskussion

5.1. Synchronisation von R.lupini Zellen nach Zellgrößenselektion

Eine synchrone Replikation des Chromosoms und eine NTG-Rückmutierbarkeit, die Voraussetzungen für die sequentielle Mutagenese, konnten in R.lupini induziert werden. Zur Induktion des synchronen Wachstums von R.lupini Zellen wurde die Verwendbarkeit der bei E.coli bekannten Synchronisationsmethoden getestet (WARD et al., 1970; LARK et al., 1963; MITCHISON et al., 1965). Durch Eingriffe in den biochemischen Ablauf der Zellen, wie sie eine Aminosäureaushungerung darstellt, führte in R.lupini nicht zum gewünschten Ausmaß an Synchronität (JESSBERGER, 1973). Ebenso war eine Blockierung der DNA-Neusynthese mit Nalidixinsäure bei R.lupini nicht möglich, da die Zellen gegen die Säure weitgehend unempfindlich reagieren.

Ohne den normalen Rhythmus des zellulären Metabolismus zu verändern, ist es mit Hilfe der Klassifizierungstechniken möglich, synchrones Wachstum zu initiieren (HELMSTETTER, 1969). Diese Verfahren beruhen auf der Selektion gleichaltriger bzw. gleichgroßer Zellen. In E.coli konnte durch Isolierung gleichaltriger Zellen synchrones Wachstum herge-

stellt werden (HELMSTETTER et al., 1964; DIX et al., 1973). Das gleiche gilt für die Selektion gleichgroßer Zellen, wobei diese Methode bei den verschiedensten Mikroorganismen Verwendung gefunden hat (KUBITSCHKE et al., 1967; HALVORSON et al., 1971; SEBASTIAN et al., 1971; MARUNOUCHI et al., 1973; BRONK et al., 1974; TAN et al., 1974).

Auch bei R.lupini bestand die Möglichkeit, die Zellen ihrer Größe nach zu ordnen und durch Isolierung gleichvolumiger Zellen synchrones Wachstum zu induzieren (Abb. 7, 8 und 9). Die Auftrennung nach Zellgröße konnte im Sucrosegradient durchgeführt werden, da die R.lupini Zellen auf osmotische Schwankungen keine Reaktion zeigten, im Gegensatz zu E.coli Zellen, deren Volumen durch den hohen osmotischen Wert der Sucroselösung im Gradient sich stark reduzierte. Dadurch ließen sich bei E.coli keine exakten Volumenbestimmungen durch Sucrosegradientenzentrifugation durchführen (Abb. 12A).

Diese Volumenverkleinerung von E.coli Zellen konnte vermieden werden durch Anzucht der Zellen in Sucrosehaltigem Nährmedium (JESSBERGER, unveröffentlicht) oder durch Verwendung einer Substanz mit niedrigem osmotischen Wert als Gradientenmaterial. Als mögliche Substanzen boten sich Metrizamid (MUNTKE-KAAS et al.,

1974), Polyvinylpyrrolidon (THOMSON et al., 1958) und Ficoll (BOLTZ et al., 1973) an. Ficoll besitzt auf Grund seines hohen Molekulargewichtes eine geringe osmotische Aktivität neben einer relativ geringen Viscosität (HOLTER et al., 1958). Diese Eigenschaft von Ficoll ermöglichte Klassifizierung und Selektion der E.coli Zellen nach ihrem Volumen, sowie die Überwachung des synchronen Wachstums anhand der Volumenänderungen der Zellen.

Die Synchronisierung der R.lupini Zellen konnte nicht nur durch Selektion der kleinsten Zellen induziert werden, auch nach Isolierung der größten Zellen aus dem Sucrosegradient wuchsen die Zellen synchron (Abb. 10). Diese Eigenschaft konnte mit Zellen mittleren Volumens nicht gezeigt werden (JESSBERGER, unveröffentlicht).

Vergleicht man nun die Größe der jeweiligen Zellen mit ihrem Alter, so fällt auf, daß man nur den Zellen mit den Extremgrößen ein bestimmtes Alter zuordnen kann. Die kleinsten Zellen befinden sich kurz nach der Zellteilung ("baby cells"), während die größten Zellen kurz vor der Teilung stehen und somit als die "ältesten" anzusehen sind. Diese Überlegung bestätigt einerseits die Annahme, daß die klassifizierten Zellen jeweils denselben physiologischen Zustand einnehmen, eine Synchronisierung jedoch wird weniger durch die

Größenselektion erreicht, als vielmehr durch Isolierung einer bestimmten Altersgruppe. Dieser Gedankengang ist nur von theoretischer Bedeutung, da das synchrone Wachstum der Zellen durch Größen- und nicht durch Altersbestimmungen überwacht wird.

Die Qualität der Synchronisierung wurde durch Volummessungen mit dem Coulter Counter bestimmt, wobei nur das Wachstum der Zellen beobachtet werden konnte. Ob auch die Replikation des Chromosoms synchron erfolgte, ließ sich nur durch Rückschlüsse ermitteln. So darf man annehmen, daß Zellen, die sich zur gleichen Zeit teilen, auch ihre DNA-Replikation synchron beenden und nach der Zellverdopplung gemeinsam mit der Replikation beginnen.

Einen Nachweis für die synchronisierte DNA-Replikation erbringt die sequentielle Mutagenese selbst. Denn wie im Modell der sequentiellen Mutagenese (4.1.) schon gezeigt, ist eine Erhöhung der Mutationsrate nur dann möglich, wenn in allen Zellen die Replikationsregion um einen bestimmten Genort zur gleichen Zeit mutiert wird. Dieses Gen muß also in allen Zellen synchron repliziert worden sein, was wiederum zur Schlußfolgerung berechtigt, daß der replikative Ablauf des Chromosoms synchronisiert vorliegt.

5.2. Die Methodik der sequentiellen Mutagenese
bei R.lupini

Die Bedingungen zur sequentiellen Mutagenese in R.lupini konnten für die in Tab. I angegebenen Stämme erfüllt werden. Die Synchronisierung der R.lupini Zellen ließ sich durch eine ZellgröÙenselektion erreichen (Abb. 9). Für die Mutagenese mit NTG konnten Mutanten ausgewählt werden, die eine hohe NTG-induzierte Rückmutationsrate besitzen (Abb. 14). Bei der Auswahl der geeigneten Stämme wurde besonderer Wert auf sta^- -Mutanten gelegt, da mit sternbildenden Bakterien eine Überwachung des synchronen Wachstums mit dem Coulter Counter erschwert bzw. unmöglich gemacht wird.

Bei der NTG-Mutagenese der synchron wachsenden R.lupini Kulturen revertierte eine unterschiedliche Anzahl der Bakterien pro Probe. Zum Vergleich der einzelnen Mutageneseschritte für einen Stamm wurde die Mutationsrate jeder Probe bestimmt. Die Mutationsrate ergibt sich aus der Korrektur der Mutantenzahl mit dem Überlebens-titer der Bakterien nach der Mutagenese.

Diese Mutationsfrequenz variiert nun ihrerseits wieder für jeden Stamm. Dabei zeigt es sich, daß die Mutationsmaxima einiger Stämme zeitlich zusammenfallen (Abb. 18-21). Vergleicht man die Generationszeiten dieser Bak-

terienkulturen, so läßt sich eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit feststellen (Abb. 17). Dieses scheinbare Zusammenfallen der Mutationsmaxima wird also nur durch die unterschiedliche Generationszeit der Bakterienstämme verursacht. Deshalb ist es für einen Vergleich der Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese nötig, die Zeitangaben für die Maxima in Bruchteilen der Generationszeiten anzugeben.

5.3. Die Replikationskarte für einige Markierungen bei R.lupini

Die Methode der sequentiellen Mutagenese, angewendet auf verschiedene synchron wachsende R.lupini Stämme, zeigte für jeweils eine chromosomale Markierung eine zeitlich unterschiedliche Mutationshäufigkeit (Abb. 18-21). Diese erhöhte Sensibilität gegenüber NTG, die zu bestimmten Zeiten bei unterschiedlichen Markierungen auftritt, bestätigt die Annahme, daß NTG besonders in der Replikationsregion Mutationen produziert. Dies steht in Übereinklang zu den Arbeiten von CERDA-OLMEDO et al., (1968), die in E.coli dieselbe Wirkungsweise von NTG beobachteten.

Diese Interpretation der NTG-Wirkung erlaubt anhand der Ergebnisse der Tab. II die Aufstellung einer Replikationskarte, wie sie in Abb. 22 dargestellt ist. Der Beginn der Replikation wird als der Zeitpunkt festgelegt, an dem die kleinsten Zellen nach ihrer Selektion in frisches Medium überimpft wurden. Die Abbildung zeigt das R.lupini Chromosom in linearer, nicht geschlossener Form mit dem Replikationsbeginn bei der cys-Markierung (links im Bild) und mit der Annahme, daß die Replikation in einer Richtung erfolgt und die Zellen in MM pro Chromosom und Generation nur eine Replikationsrunde beginnen.

In dieser Replikationskarte sind fast alle Markierungen (außer ilv) zweimal vertreten. So erscheint z.B. die kan-Markierung so ziemlich am Anfang und am Ende der Replikationskarte. Das gleiche gilt für die cys-Markierung, wie aus Abb. 18 zu entnehmen ist. Die Mutationsfrequenz im cys-Gen erreicht innerhalb der untersuchten Zeit zwei Maximalwerte, wobei das erste Maximum schon bei Replikationsbeginn auftritt. Für das zweite Maximum läßt sich aber nicht feststellen, ob die Mutationserhöhung am Ende oder am Anfang einer neuen Replikationsrunde liegt. Deshalb wurde die cys-Markierung zweimal in die Replikationskarte eingetragen.

Eine Ausnahme bildet die Markierung im ilv-Gen, die nur einmal und zwar in der Mitte der Generationszeit häufiger mutiert wird (Abb. 20B, Tab. II). Eine mögliche Erklärung findet sich in der Annahme, daß zwei Mutationsmaxima zusammengefallen sind.

Eine Bestätigung für dieses zweimalige Auftreten der Mutationsmaxima pro Generation kann man der Tatsache entnehmen, daß in sechs getrennten Versuchen mit der str-Markierung ungefähr das gleiche Ergebnis erhalten wurde. Ebenso läßt sich ein Mittelwert aus mehreren Versuchen für die kan- und his-Markierungen ermitteln. Die Einzelergebnisse weichen nicht erheblich vom Mit-

telwert ab. Dies läßt den Schluß zu, daß jede Markierung auf dem R.lupini Chromosom innerhalb einer Generationszeit zweimal repliziert wird.

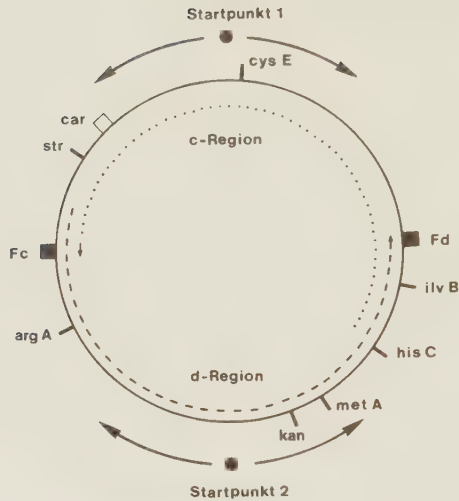
5.4. Das Replikationsmodell für R.lupini

Es ist nun von besonderem Interesse, diese Replikationskarte mit der genetischen Karte des R.lupini Chromosoms zu vergleichen, die durch Konjugationsexperimente aufgestellt wurde (HEUMANN et al., 1973). Dabei lassen sich die Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese mit dieser "Konjugationskarte" in Einklang bringen, wenn das R.lupini Chromosom bidirektional repliziert wird und die Replikation an zwei, auf dem Chromosom gegenüberliegenden Punkten beginnt.

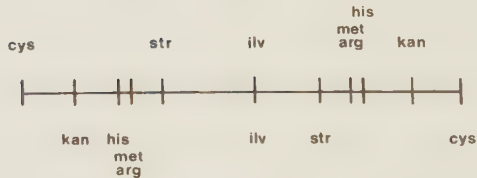
5.4.1. Bidirektionale Replikation des R.lupini Chromosoms

Die bidirektionale Replikation des R.lupini Chromosoms läßt sich aus der Gegenüberstellung der Konjugations- und der Replikationskarte ableiten, wie sie in Abb. 23 dargestellt ist. Betrachtet man auf der Konjugationskarte den Startpunkt 1 und auf der Replikationskarte die Markierungen, die oberhalb der Linie eingezeichnet sind, so lassen sich folgende Aussagen belegen: In der Konjugationskarte liegen

die Markierungen str und cys in der c-Region, ilv, his, met, kan und arg in der d-Region. Die Markierungen met und arg befinden sich weit getrennt in der d-Region, während sie anhand der Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese (Abb. 23) zur gleichen Zeit repliziert wurden. Weiterhin fällt auf, daß in der Replikationskarte ilv der Markierung str folgt, obgleich in der Konjugationskarte die beiden Markierungen fast diametral gegenüberliegen. Diese scheinbare Diskrepanz kann nur dadurch erklärt werden, daß die Replikation nicht wie in Abb. 22 angenommen unidirektional, sondern in zwei entgegengesetzten Richtungen erfolgt; denn bei einer bidirektionalen Replikation des Chromosoms können getrennt liegende Markierungen zur gleichen Zeit repliziert werden, wenn sie nur im selben Abstand vom Replikationsbeginn liegen. In anderen Bakterien konnte ebenfalls diese Art der Replikation nachgewiesen werden. Anhand verschiedenster Techniken wurde der Beweis für eine bidirektionale Replikation des Chromosoms in E.coli (MASTERS et al., 1971; BIRD et al., 1972; YAHARA, 1972; JONASSON, 1973; PRESCOTT et al., 1972; HOHLFELD et al., 1973), in Salmonella typhimurium (NISHIOKA et al., 1970; FUJISAWA et al., 1973) und in Bacillus subtilis (GYURASITS et al., 1973; HARA et al., 1973) erbracht.



Konjugationskarte



Replikationskarte

Abb. 23: Vergleich der Konjugations- und Replikationskarte von *R. lupini*.

Die Konjugationskarte enthält nur die Markierungen, die zur sequentiellen Mutagenese verwendet wurden. Die Lage der Markierungen ist nach Konjugationsexperimenten bestimmt worden (HEUMANN et al., 1973). Die Replikationskarte entspricht der Abb. 22.

5.4.2. Zwei Startpunkte der Replikation des
 R.lupini Chromosoms

Mit der Annahme der bidirektionalen Replikation ist aber noch nicht geklärt, warum fast alle Markierungen zweimal während einer Generationszeit mutiert und damit auch repliziert werden (siehe Tab. II und Abb. 22). Diese Besonderheit läßt sich wie folgt diskutieren.

Die Abb. 18 zeigt das Mutationsmaximum des cys-Gens sofort bei Beginn des synchronen Wachstums. Dies läßt vermuten, daß das cys-Gen als eines der ersten Gene des Chromosoms repliziert wird. Nimmt man also an, daß die cys-Markierung den Replikationsbeginn darstellt, so lassen sich die Markierungen der Replikationskarte, die in Abb. 22 in der oberen Hälfte eingezeichnet sind, mit der Chromosomenkarte in Übereinstimmung bringen: str wird zum Beispiel nach ca. einem Drittel (1. Maximum in Tab. II) und kan nach 0.88 (2. Maximum in Tab. II) der Generationszeit repliziert (Abb. 24, Start 1).

Betrachtet man aber in Abb. 18 das 2. Maximum der Mutationsfrequenz für das cys-Gen, so läßt sich nicht feststellen, ob die Mutationserhöhung am Ende oder am Anfang einer neuen Replikationsrunde liegt (siehe 5.3.). Nimmt man an, daß das cys-Gen als letztes aller untersuchten Gene repliziert wurde, so käme der Replikations-

beginn auf dem Chromosom diagonal gegenüber dem cys-Gen zu liegen. Mit dieser Überlegung ließe sich der untere Teil der in Abb. 22 dargestellten Markierungen erklären: Kan mit der Replikationszeit von 0.11 (1. Maximum in Tab. II) liegt in der Konjugationskar-te rechts unten in der d-Region und würde demnach als erste der untersuchten Markierungen repliziert werden, während der Replikationspunkt erst nach zwei Dritteln der Zeit das str-Gen (2. Maximum in Tab. II) erreichte (Abb. 24, Start 2).

Diese Ergebnisse lassen sich nur durch die Vorstellung in Einklang bringen, daß das R.lupini Chromosom zwei Anfangsregionen für die Replikation besitzt. Der eine Replikationsstart liegt nach diesem Modell in der c-Region neben dem cys-Gen, der andere diametral gegenüber in der d-Region zwischen den Markierungen kan und arg.

Zur Regulation der Replikation muß man annehmen, daß die Wahl eines Startpunktes ein Verbot des anderen mit sich bringt, da sonst die Replikation nach $1/4$ der Generationszeit beendet sein müßte. Dies bedeutet, daß in einer beliebigen Zelle einer R.lupini Kultur die Replikation in der c-Region, in einer anderen Zelle in der d-Region beginnt. Somit wird das str-Gen zum Beispiel in der ersten Zelle zum Zeitpunkt 0.32 und in

der zweiten Zelle zum Zeitpunkt 0.67 repliziert. Damit erklärt sich, warum in den Ergebnissen der sequentiellen Mutagenese pro Generation zwei Mutationsmaxima auftreten (Tab. II).

Dieses Modell, das pro Chromosom zwei Positionen für den Replikationsstart vorschlägt, findet indirekt Bestätigung durch eine Eigenschaft des R.lupini Chromosoms. Wie in der Einleitung schon erwähnt, besitzt das R.lupini Chromosom zwei Transfer-Regionen, die je nach Fertilitätstyp getrennt übertragen werden können (HEUMANN et al., 1973). Beide Regionen besitzen also eine gewisse Eigenständigkeit, die durch den Besitz einer eigenen Replikationsmaschinerie noch bestärkt würde. Durch die Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese wird diese Überlegung bekräftigt.

Unabhängig von der Methode der sequentiellen Mutagenese konnte auch in B.subtilis das Vorhandensein eines zweiten Replikationsbeginns gezeigt werden (COPELAND, 1974).

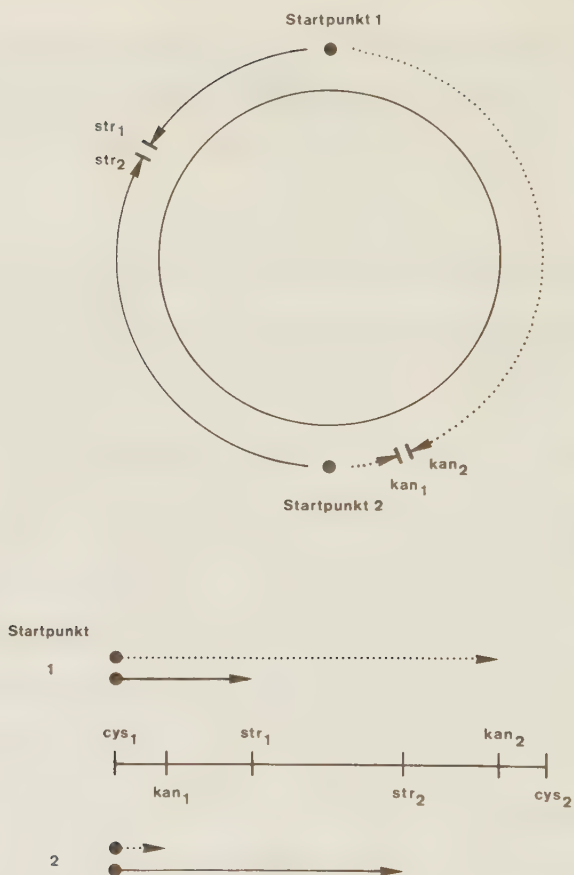


Abb. 24: Replikationsmodell des *R. lupini* Chromosoms.

Das Modell stellt eine bidirektionale Replikation von zwei Startpunkten bis zu den Markierungen str und kan dar. Die lineare Anordnung des Chromosoms (unterer Bildabschnitt) ist Abb. 22 entnommen. Die ringförmige Anordnung des Chromosoms (oberer Bildabschnitt) entspricht der Konjugationskarte und zeigt die Lage der Markierungen str und kan nach den Ergebnissen der Tab. II. Die Indizes 1 und 2 der Markierungen str und kan (str₁, str₂; kan₁, kan₂) weisen auf das 1. bzw. 2. Maximum der Tab. II.

5.5. Die Genkarte des R.lupini Chromosoms, auf-
gestellt mit Hilfe der sequentiellen Muta-
genese

Die Reihenfolge der Gene auf dem R.lupini Chromosom läßt sich aus der Konjugations- und Replikationskarte ersehen. In der Konjugationskarte sind die Abstände der Gene für die c-Region durch ihr Rekombinantenverhältnis, für die d-Region durch eine Transfergradientenanalyse bestimmt und werden als relative Werte angegeben (HEUMANN et al., 1973). Mit Hilfe der sequentiellen Mutagenese können nun die echten Abstände der Markierungen auf dem Chromosom gemessen werden. Die Distanz der Gene ergibt sich aus dem zeitlichen Abstand zwischen dem jeweiligen Mutationsmaximum und dem Replikationsstart bzw. Beginn des synchronen Wachstums der Zellen. Die Entfernung der Gene vom Replikationsbeginn ist aus Tab. II ersichtlich.

Über die Größe der beiden Transferregionen des R.lupini Chromosoms (c- und d-Region) kann mit den Konjugationsexperimenten keine Aussage gemacht werden. Die Konjugationsexperimente zeigen lediglich, daß die distalen Teile jeder Transferregion in den proximalen Teil der anderen Region hineinragt und somit das Chromosom ringförmig vorliegt (HEUMANN et al., 1973).

Die Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese dagegen erlauben einen Vergleich über die Größe der beiden Regionen. Wie aus Tab. II zu entnehmen ist, ergibt die Summe der Replikationszeiten für eine Markierung und eine Generation (1. und 2. Maximum) den Wert 1; außerdem wird die Markierung ilv sowohl vom Startpunkt 1 als auch vom Startpunkt 2 der Replikation nach ungefähr der halben Generationszeit repliziert. Daraus läßt sich unschwer ableiten, daß die c-Region die gleiche Größe wie die d-Region besitzen muß.

Wie präzise die Methode der sequentiellen Mutagenese ist, läßt sich aus dem Vergleich der Konjugationskarte und der Replikationskarte ansehen (Abb. 25). Hat man einmal die Lage der Markierungen mit Hilfe der Konjugationskarte bestimmt, ob sie rechts oder links des Startpunktes der Replikation liegen, so stellt man fest, daß sich die Markierungen ungefähr am selben Ort in der Replikations- wie Konjugationskarte befinden.

Eine Ausnahme bildet die Markierung his C: Nach der Konjugationskarte ist die Transferreihenfolge his C - met A; in der Replikationskarte wird aber vom Startpunkt 1 aus his C nach met A repliziert. Diese Reihenfolge ergibt sich aus den Mittelwertberechnungen der Tab. II. Betrachtet man die einzelnen Versuche für die his-Markierung, so zeigt sich im Experiment Nr. 5, daß die his-

Markierung schon nach einer Generationszeit von 0.67 und damit vor met A repliziert wird. Da aber in den anderen Versuchen die Replikation von his C später erfolgt (0.88; 0.83; 0.75), verschiebt sich der Mittelwert über 0.67. Dieses Ergebnis muß durch weitere Experimente abgeklärt werden.

Trotz dieser Variante läßt sich die Aufstellung einer Replikationskarte an Hand der Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese rechtfertigen.

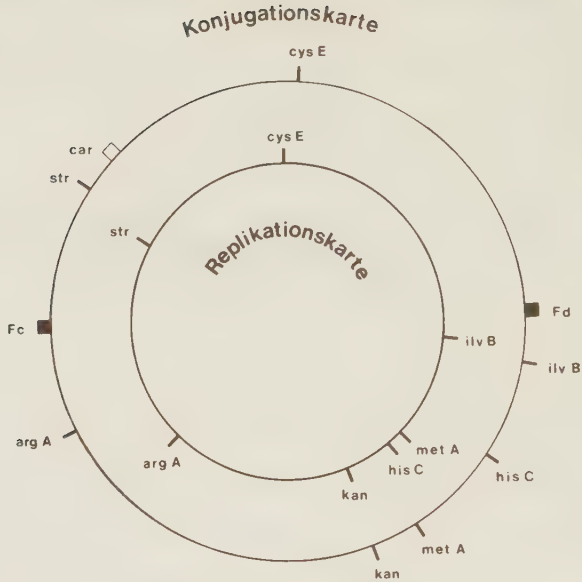


Abb. 25: Vergleich der Lage der untersuchten Markierungen in Konjugations- und Replikationskarte von R_{lupini}.

Weitere Erklärungen siehe Text.

Zusammengefaßt lassen sich die Ergebnisse der sequentiellen Mutagenese in R.lupini folgendermaßen interpretieren: Auf Grund der gleichen Mutationszeit der Markierungen mit und arg fordert ein Vergleich mit der genetischen Karte die bidirektionale Replikation des R.lupini Chromosoms. Die Mutationsfrequenz zeigt für alle Markierungen außer ilv zwei Maxima pro Generation. Erklärung findet dieses Ergebnis in der Annahme, daß das R.lupini Chromosom pro Transferregion einen Replikationsanfang besitzt, der ungefähr die Mitte jeder Region einnimmt. Damit erklärt sich auch, warum die Markierung ilv nur ein Mutationsmaximum aufweist: diese liegt in der Mitte zwischen den beiden Replikationspunkten, so daß ilv, gleich aus welcher Richtung die Replikationsgabel kommt, immer zur gleichen Zeit (nach ungefähr der Hälfte der Zeit) repliziert wird.

Herrn Prof. Dr. W. Heumann danke ich für die Überlassung dieses Themas und für seine Betreuung und Unterstützung der Arbeit. Besonderen Dank gilt auch Herrn Dr. A. Pühler für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für anregende Diskussionen. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dipl. Biol. K. Schmid und all jenen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie, die mir in Einzelfragen geholfen haben.

6. Literaturverzeichnis

- BIRD, R.E., J. LOUARN, J. MARUSCELLI, and L.G. CARO, 1972
The origin and sequence of chromosome
replication in Escherichia coli
J. Mol. Biol., 70, 549-566
- BOLTZ, R.C.Jr., P. TODD, M.J. STREIBEL, and M.K. LOUIE, 1973
Preparative electrophoresis of living mammalian
cells in a stationary ficoll gradient
Prep. Biochem., 3, 383-401
- BOTSTEIN, D. and E.W. JONES, 1969
Nonrandom mutagenesis of the Escherichia coli
genome by nitrosoguanidine
J. Bact., 98, 847-848
- BRONK, B.V., G.J. DIENES, R. SCHINDLER, and J.R. GAUTSCHI,
1974. Kinetic cell-cycle analysis of a
cultured mammalian cell population
Biophys. J., 14, 607-624
- CERDA-OLMEDO, E., and P.C. HANAWALT, 1968
Diazomethane as the active agent in nitroso-
guanidine mutagenesis and lethality
Mol. Gen. Genet., 101, 191-202
- CERDA-OLMEDO, E., P.C. HANAWALT, and N. GUEROLA, 1968
Mutagenesis of the replication point by
nitrosoguanidine: Map and pattern of
replication of the Escherichia coli chromosome
J. Mol. Biol., 33, 705-719

COPELAND, J.C., 1974

The Bacillus subtilis genome:
Replication-order and map-position discrepancies -
evidence for a second origin
Genetics, 78, 1015-1034

DEMEREK, M., E.A. ADLBERG, A.J. CLARK, and P.E. HARTMANN,
1966. A proposal for a uniform nomenclature
in bacterial genetics
Genetics, 54, 61-76

DIX, D.E., and C.E. HELMSTETTER, 1973
Coupling between chromosome completion and
cell division in Escherichia coli
J. Bact., 115, 786-795

DRUCKREY, H., R. PREUSSMAN, S. IVANOVIC, B.T. SO,
C.H. SCHMIDT und J. BUEHLER, 1966
Zur Erzeugung subcutaner Sarkome in Ratten
Z. Krebsforschung, 68, 87

FUJISAWA, T., and A. EISENSTARK, 1973
Bi-directional chromosomal replication in
Salmonella typhimurium
J. Bact., 115, 168-176

GOSS, W.A., W.H. DEITZ, and T.M. COOK, 1965
Mechanism of action of nalidixic acid on
Escherichia coli. II. Inhibition of
deoxyribonucleic acid synthesis
J. Bact., 89, 1068-1074

- GYURASITS, E.B., and R.G. WAKE, 1973
Bidirectional chromosome replication in
Bacillus subtilis
J. Mol. Biol., 73, 55-63
- HALVORSON, H.O., B.L.A. CARTER, and P. TAURO, 1971
Use of synchronous cultures of yeast to
study gene position
Methods in Enzymology, 21, 462-470
- HARA, H., and H. YOSHIKAWA, 1973
Asymmetric bidirectional replication of
Bacillus subtilis chromosome
Nature New Biol., 244, 200-203
- HELMSTETTER, C.E., 1969
Methods for studying the microbial division
cycle
Methods in Microbiology, 1, 327-363
- HELMSTETTER, C.E., and D.J. CUMMINGS, 1964
An improved method for the selection of
bacterial cells at division
Biochim. Biophys. Acta, 82, 608-610
- HEUMANN, W., 1968
Conjugation in starforming Rhizobium lupini
Molec. Gen. Genetics, 102, 132-144
- HEUMANN, W., A. PÜHLER, and E. WAGNER, 1971
The two transfer regions of the Rhizobium
lupini conjugation. I. Fertility factor
elimination and one way transfer
Mol. Gen. Genet., 113, 308-315

HEUMANN, W., A. PÜHLER, and E. WAGNER, 1973

The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation. II. Genetic characterisation of the transferred chromosomal segments

Mol. Gen. Genet., 126, 267-274

HILLIGER, M. und F. BERGTER, 1974

DNS-Synthese und Zellteilung in Escherichia coli 15 TAU nach Substratlimitation

Z. Allg. Mikrobiol., 14, 103-107

HOHLFELD, R. and W. VIELMETTER, 1973

Bidirectional growth of the Escherichia coli chromosome

Nature New Biology, 242, 130-132

HOLTER, H. and K.M. MØLLER, 1958

A substance for aqueous density gradients

Experimental Cell Research, 15, 631-632

JESSBERGER, B., 1973

Untersuchung der mutagenen Wirkung von NTG auf Rhizobium lupini als Grundlage zur sequentiellen Mutagenese Kartierung

Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg

JESSBERGER, B., A. PÜHLER und W. HEUMANN, 1974

Sequentielle Mutagenese in Rhizobium lupini

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A, 228, 162-167

JONASSON, J., 1973

Evidence for bidirectional chromosome replication in Escherichia coli C based on marker-frequency analysis by DNA-DNA hybridization with P 2 and prophages

Mol. Gen. Genet., 120, 69-94

- KUBITSCHKEK, H.E., 1969
Counting and sizing micro-organisms with
the Coulter Counter
Methods in Microbiology, 1, 594-610
- KUBITSCHKEK, H.E., H.E. BENDIGKEIT, and M.R. LOKEN, 1967
Onset of DNA synthesis during the cell
cycle in chemostat cultures
Proc. Nat. Acad. Sci, 57, 1611-1617
- LARK, K.G., R. REPKO, and E.J. HOFFMANN, 1963
The effect of amino acid deprivation on
subsequent deoxyribonucleic acid replication
Biochim. Biophys. Acta, 73, 9-24
- MASTERS, M., and P. BRODA, 1971
Evidence for the bidirectional replication
of DNA in Escherichia coli chromosome
Nature, 232, 137-140
- MATTES, R., 1974
Analyse des Thymidin-Stoffwechsels, Thymidin-
abhängiger Mutanten und der molekularen Ge-
stalt des Resistenzfaktor RP 4 in Rhizobium
lupini
Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg
- MARUNOUCHI, T., and W. MESSER, 1973
Replication of a specific terminal chromosome
segment in Escherichia coli which is required
for cell division
J. Mol. Biol., 78, 211-228
- MITCHISON, J.M., and W.S. VINCENT, 1965
Preparation of synchronous cell cultures by
sedimentation
Nature, 205, 987-989

MUNTHER - KAAS, A.C., and P.O. SEGLEN, 1974

The use of metrizamide as a gradient medium
for isopycnic separation of rat liver cells
Febs. letters, 43, 252-256

NISHIOKA, Y., and A. EISENSTARK, 1970

Sequence of genes replicated in Salmonella
typhimurium as examined by transduction
techniques
J. Bact., 102, 320-333

PRESCOTT, D.M., and P.L. KEUMPEL, 1972

Bidirectional replication of the chromosome
in Escherichia coli
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2842-2845

SEBASTIAN, J., B.L.A. CARTER, and H.O. HALVORSON, 1971

Use of yeast populations fractionated by
zonal centrifugation to study the cell cycle
J. Bact., 108, 1045-1050

TAN, I., W. HARTMANN, U. GUNTERMANN, A. HÜTTERMANN, and
H. KÜHLWEIN, 1974. Studies on the cell cycle

of Mycobacter AL-1. I. Size fractionation
of exponentially growing cells by zonal centri-
fugation

Arch. Microbiol., 100, 389-396

THOMSON, J.F., and F.J. KLIPPEL, 1958

Fractionation of rat liver particulates
using polyvinylpyrrolidone gradients
Exptl. Cell Res., 14, 612-614

VIELMETTER, W., W. MESSER, and A. SCHÜTTE, 1968
Growth direction and segregation of the
Escherichia coli chromosome
Cold Spring Harbor Symp., 33, 585-598

WARD, C.B., M.W. HANE, and D.A. GLASER, 1970
Synchronous reinitiation of chromosome
replication in Escherichia coli B/r after
nalidixic acid treatment
Proc. Nat. Acad. Sci., 66, 365-369

YAHARA, I., 1972
The origin and direction of chromosomal
replication in Escherichia coli
Japan. J. Genet., 47, 33-34

Lebenslauf

20. 2. 1948 als Sohn des Arztes für Allgemein-
Medizin Dr. med. Josef Jeßberger und
dessen Ehefrau Rosemarie, geb. Müller,
in Bad Neustadt/Saale geboren
- Sept. 54 - Juli 58 Volksschule, Unsleben, Ufr., Bayern
- Sept. 58 - Juli 67 Hum. Schönborn-Gymnasium, Münnerstadt,
Ufr., Bayern
21. Juli 1967 Reifezeugnis des Hum. Schönborn-
Gymnasiums
- Nov. 67 - Juli 68 Studium der Biologie an der Maximilian-
Universität, Würzburg
- Nov. 68 - Febr. 73 Studium der Biologie an der Friedrich-
Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg
4. Mai 1970 Diplomvorprüfung in Biologie
27. Febr. 1973 Diplomhauptprüfung in Biologie
Diplomarbeit: Untersuchung der mutage-
nen Wirkung von NTG auf Rhizobium
lupini als Grundlage zur sequentiellen
Mutagenese Kartierung

(Berthold Jeßberger)

